



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος των miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών

ΤΣΑΠΡΟΥΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2016

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Αλέξανδρος Δαπόντε, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλος: Μαρία Σάτρα, ΕΔΙΠ

Μέλος: Χριστίνα Μεσσήνη, Λέκτορας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγγραφή μιας διπλωματικής εργασίας σημαίνει το τέλος μιας δύσκολης, αλλά ταυτόχρονα και μιας εποικοδομητικής περιόδου, μέσα στην οποία πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η παρακολούθηση των μεταπτυχιακών σπουδών. Πρόκειται για μια διαδικασία, η οποία για να ολοκληρωθεί απαιτεί τη συμβολή κάποιων ανθρώπων που παρέχουν όχι μόνο ψυχολογική υποστήριξη, αλλά ταυτόχρονα συνδράμουν με τις γνώσεις και το ερευνητικό τους έργο στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Οι αρχικές μου ευχαριστίες απευθύνονται στον κύριο **Αλέξανδρο Ι. Δαπόντε**, Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας, Διευθυντή του προγράμματος των μεταπτυχιακών σπουδών “Βιολογία της Αναπαραγωγής”, καθώς και επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ τη σύμβουλο της Διπλωματικής μου εργασίας κυρία **Μαρία Σάτρα**, Ε.ΔΙ.Π. Εργαστήριο Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς χωρίς τη βοήθειά της η ολοκλήρωση της εργασίας θα ήταν πολύ δύσκολη. Το ενδιαφέρον της, οι υποδείξεις, η καθοδήγηση και η συμπαράσταση της ήταν πολύ σημαντικά.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους **καθηγητές** μου στο πρόγραμμα των μεταπτυχιακών σπουδών “Βιολογία της Αναπαραγωγής” και ειδικά την κυρία **Χριστίνα Μεσσήνη**, που με την πολυετή εμπειρία τους μου μετέδωσαν τις απαραίτητες γνώσεις, αλλά και τις νεότερες εξελίξεις στην επιστήμη τους.

Τέλος, ευχαριστώ τόσο το ανθρώπινο δυναμικό του Μεταπτυχιακού Προγράμματος για τη βοήθειά του, όσο και τους **συμφοιτητές** και τις **συμφοιτήτριές** μου για την αλληλοϋποστήριξή τους κατά τη διάρκεια των σπουδών αυτών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.	miRNAs: Πώς ανακαλύφθηκαν	3
1.2.	miRNAs: Χαρακτηριστικά	3
1.3.	miRNAs: Βιογένεση	4
1.4.	miRNAs: Λειτουργία	6
1.5.	miRNAs: Ανάπτυξη και Διαφοροποίηση	7
1.6.	miRNAs και κυκλοφορία	8
1.7.	miRNAs: Μέθοδοι απομόνωσης	9

2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

2.1.	Εισαγωγή	10
2.2.	miRNAs και καρκίνος	11
2.3.	miRNAs ως ογκοκατασταλτικά γονίδια και ως ογκογονίδια	11
2.4.	miRNAs και μηχανισμοί απορρύθμισης	13
2.5.	miRNAs και σηματοδοτικά μονοπάτια	13
2.6.	miRNAs ως θεραπευτικά μόρια κατά του καρκίνου	14

3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

3.1.	Εισαγωγή	16
3.2.	Επιδημιολογία	16
3.3.	Παράγοντες κινδύνου	17
3.4.	Παθοφυσιολογία	19
3.5.	Διάγνωση	20
3.6.	Σταδιοποίηση	21
3.7.	Πρόγνωση	22
3.8.	Θεραπεία	23

4. miRNAs & ΜΟΡΙΑΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

4.1.	Μοριακό προφίλ των υψηλού βαθμού κακοήθειας ΕΚΩ	24
4.1.1.	miRNAs και μεταβολές του αριθμού των αντιγράφων	24
4.1.2.	miRNAs και επιγενετικές αλλαγές	25
4.1.3.	TP53	26

4.1.4. BRCA1 και BRCA2	26
4.2. Μοριακό προφίλ των χαμηλού βαθμού κακοήθειας ΕΚΩ	26
4.3. miRNAs και γονίδια στόχοι	27
5. miRNAs & ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΩΟΘΗΚΩΝ	
5.1. Το προφίλ της έκφρασης των miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών	29
5.2. miRNAs ως ρυθμιστές της μετάστασης	31
5.2.1. miRNAs και βλαστικά καρκινικά κύτταρα	31
5.2.2. miRNAs και επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMM)	32
5.2.3. miRNAs και εξωκυττάρια τροποποίηση της θεμέλιας ουσίας (ECM)	35
5.2.4. miRNAs και αγγειογένεση	36
5.3. Μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια και ΕΚΩ	38
5.4. miRNAs ως ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου	39
6. miRNAs & ΔΙΑΓΝΩΣΗ	
6.1. Διαγνωστικοί βιοδείκτες	41
6.1.1. Σύγχρονοι βιοδείκτες	41
6.1.2. miRNAs ως διαγνωστικοί δείκτες	42
6.2. miRNAs ως ρυθμιστές των πρωτεϊνικών βιοδεικτών	45
6.3. miRNAs ως προγνωστικοί δείκτες	47
6.4. miRNAs και χημειοαντοχή	49
6.5. miRNAs ως θεραπευτικοί στόχοι	53
6.6. miRNAs ως βιοδείκτες ανταπόκρισης ή μη στη θεραπεία	55
6.7. Θεραπεία	55
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	59
8. ΣΥΝΟΨΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. miRNAs: Πώς ανακαλύφθηκαν

Η ανακάλυψη των microRNA γονιδίων μας οδηγεί στο 1993 όταν ο Victor Ambros και οι συνεργάτες του μελετούσαν τη ρύθμιση του κύκλου ανάπτυξη των νυμφών στον οργανισμό *C.elegans*. Οι μελέτες τους, οδήγησαν στη διαπίστωση ότι το γονίδιο *lin-4* δεν παρήγαγε κάποια πρωτεΐνη όπως ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με το Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας, αλλά αντί αυτού το συγκεκριμένο γονίδιο παρήγαγε μικρά μόρια RNA μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων με αδιευκρίνιστο μηχανισμό λειτουργίας. Για αρκετά μεγάλο διάστημα το *lin-4* ήταν το μόνο παράδειγμα ενδογενούς ρυθμιστικού μορίου RNA. Επτά χρόνια αργότερα η κατάσταση άλλαξε δραματικά όταν διαπιστώθηκε από το εργαστήριο του Ruvkun ότι και ένα άλλο γονίδιο του *C.elegans* το γονίδιο *let-7* είχε παρόμοια συμπεριφορά με το προηγούμενο και παρήγαγε ένα παρόμοιο μικρό μόριο περίπου 22 νουκλεοτιδίων. Μέχρι το 2000 ομόλογα των προηγούμενων γονιδίων είχαν εντοπιστεί στον άνθρωπο, στη *Drosophila* και σε άλλα 11 διμερή ζώα. Εξαιτίας της κοινής τους εμπλοκής στη χρονική ρύθμιση της ανάπτυξης τα γονίδια *lin-4* και *let-7* πήραν την ονομασία μικρής διάρκειας-RNA (small temporal RNA, stRNA).

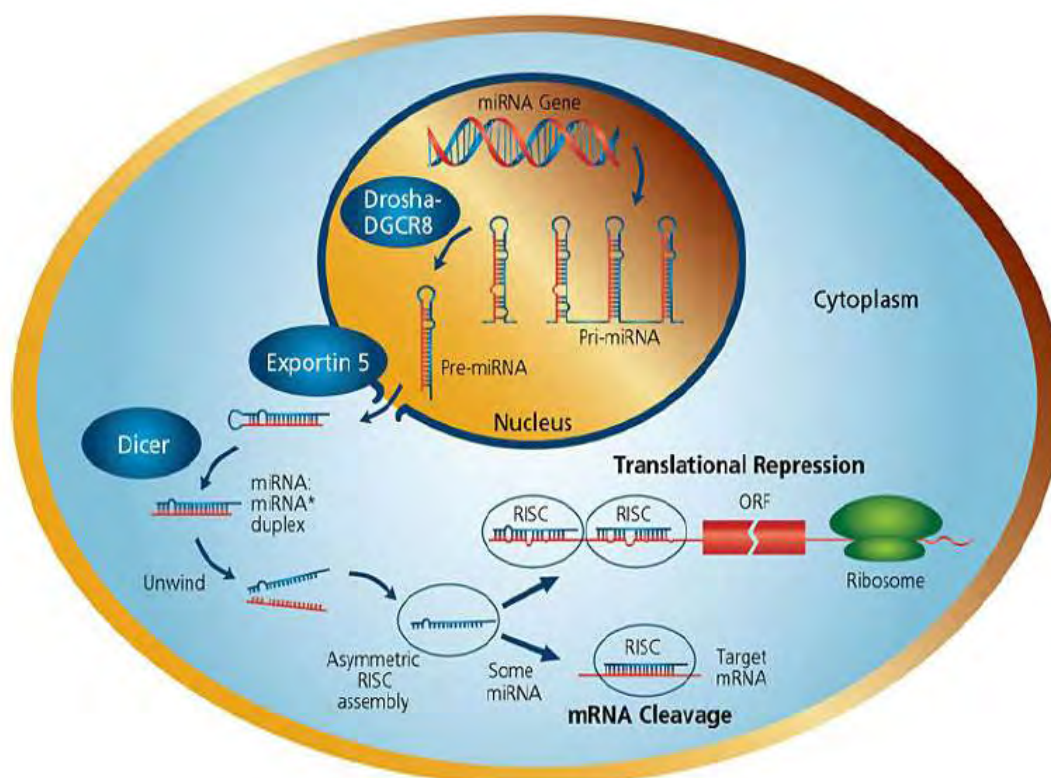
1.2. miRNAs: Χαρακτηριστικά

Τα miRNAs είναι μικρά, μη κωδικοποιούντα μόρια RNA (μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων) που εμπλέκονται στην αρνητική μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, δεσμεύοντας περιοχές αγγελιοφόρων RNA (mRNAs). Οι αλληλουχίες των miRNAs παρουσιάζουν υψηλή εξελικτική συντήρηση (highly conserved) μεταξύ φυτών, μικροοργανισμών και ζώων, καταδεικνύοντας ότι πρόκειται για ένα συγκριτικά παλαιό και σημαντικό τρόπο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Περίπου το ένα τρίτο των ανθρώπινων γονιδίων ρυθμίζονται από miRNAs. Τα miRNAs ενέχονται στη ρύθμιση σχεδόν όλων των φυσιολογικών κυτταρικών διαδικασιών όπως η διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική απόπτωση και ο κυτταρικός μεταβολισμός (1). Τα miRNAs έχουν συχνά πολλά γονίδια στόχους (δηλαδή πολλά mRNAs), συνεπώς ένα miRNA μπορεί να επηρεάζει πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες. Ταυτόχρονα, ένα αγγελιοφόρο RNA (mRNA)

μπορεί να ρυθμίζεται από πολλά διαφορετικά miRNAs με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πολύπλοκου μοριακού δικτύου.

1.3. miRNAs: Βιογένεση

Τα γονίδια των microRNAs βρίσκονται είτε σε περιοχές του γονιδιώματος που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, είτε στα εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Η μεταγραφή τους εκπονείται από την RNA polymerase II (Pol II) από την οποία προκύπτει το πρώιμο microRNA (primary microRNA pri-microRNA), (μεγέθους εκατοντάδων έως χιλιάδων νουκλεοτιδίων), μια αρχική μορφή που φέρει καλύπτρα (cap) στο 5' άκρο, poly(A) ουρά (poly-A tail) στο 3' άκρο και έχει δομή φουρκέτας (hairpin loop/stem loop). Τα pri-microRNAs, στη συνέχεια, διασπώνται σε πρόδρομα microRNAs (precursor microRNA/pre-microRNA) (μήκους 70 νουκλεοτιδίων περίπου) από το πυρηνικό σύμπλοκο μικροεπεξεργασίας που αποτελείται από τις Drosha και Pasha. Η Drosha είναι μια ενδονουκλεάση τύπου RNAάση III και δρα μαζί με την Pasha (ή DGCR8), μια πρωτεΐνη με περιοχές δέσμευσης του δίκλωνου RNA. Μέσω αυτής της ιδιότητας η Pasha αναγνωρίζει τη δομή φουρκέτας του pri-microRNA και προσανατολίζει την Drosha, η οποία διασπά το μόριο RNA. Το προϊόν που προκύπτει (pre-microRNA) διαθέτει δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο και μια φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο, ως αποτέλεσμα της ριβονουκλεοπρωτεϊνικής δράσης της.



Εικόνα 1. Η βιογένεση των *miRNAs*

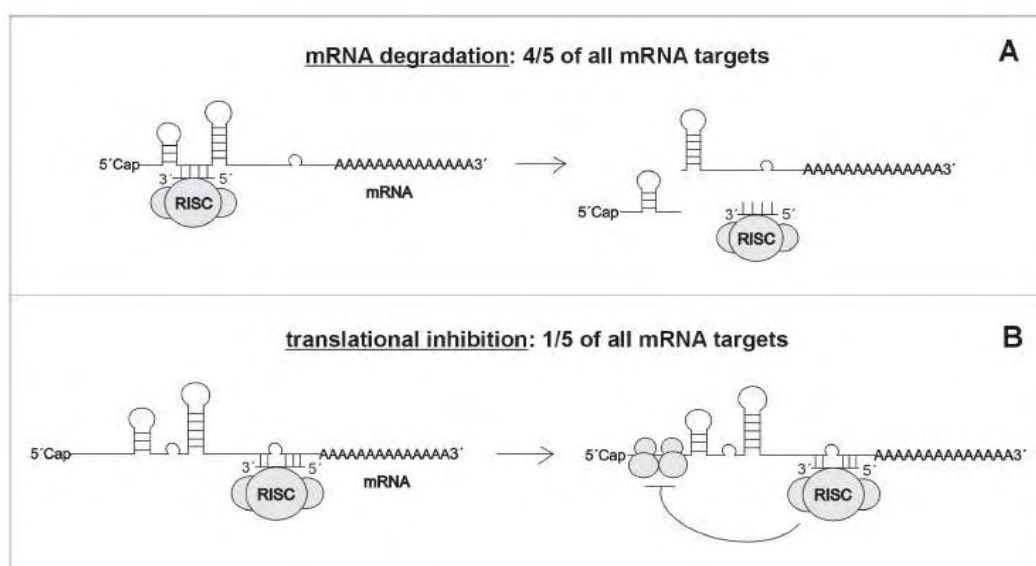
Η exportin-5 αναγνωρίζει τα δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο των pre-microRNAs και τα μεταφέρει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα χρησιμοποιώντας GTP. Εξερχόμενο στο κυτταρόπλασμα το πρόδρομο microRNA (pre-microRNA) διασπάται σε ένα ατελώς δίκλωνο μόριο RNA (~22 nt) με τη βοήθεια της ριβονουκλεάσης Dicer. Η πρωτεΐνη αυτή δρα ως ενδονουκλεάση τύπου RNase III και έχει ως συμπαράγοντα την πρωτεΐνη TRBP (TAR RNA binding protein). Το δίκλωνο μόριο που προκύπτει αποτελείται από το ώριμο microRNA (guide strand) και το συμπληρωματικό του (passenger strand, microR*). Το microR* (passenger strand) είναι βραχύβιο και διασπάται, ενώ το ώριμο microRNA ενσωματώνεται στο RNA επαγόμενο σύμπλοκο αποσιώπησης (RISC RNA induced silencing complex), το οποίο περιλαμβάνει την υποοικογένεια Argonaute (AGO) ως κύριο συστατικό.

Στον άνθρωπο συναντάμε δυο υποοικογένειες των πρωτεϊνών Argonaute, την υποοικογένεια EIF2C/AGO 1-4 και την υποοικογένεια Piwi 1-4. Η υποοικογένεια AGO έχει παρατηρηθεί σε ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς ενώ η υποοικογένεια Piwi περιγράφεται μόνο σε ζώα και μάλιστα αποκλειστικά στα γεννητικά κύτταρα (germ cells). Χαρακτηριστικό τους αποτελούν τέσσερις περιοχές η N, η PAZ, η PIWI και η

MID. Η πρώτη είναι το αμινοτελικό άκρο των Argonaute. Η δεύτερη είναι περιοχή πρόσδεσης μορίων RNAs (αναγνωρίζει το 3' ακρο τους). Η τρίτη περιοχή βρίσκεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο και για κάποιες Argonaute πρωτεΐνες έχει δράση ενδονουκλεάσης. Τέλος, η τέταρτη περιοχή MID βρίσκεται ανάμεσα στις άλλες δυο περιοχές και δεσμεύει το 5' άκρο των μικρών μορίων RNAs. Έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη AGO2 είναι το μόνο μέλος της ανθρώπινης υποοικογένειας πρωτεϊνών AGO που έχει ενδονουκλεολυτική δράση και συμμετέχει στην μέσω των microRNA αρνητική ρύθμιση της έκφρασης των mRNAs (1) (Εικόνα 1).

1.4. miRNAs: Λειτουργία

Ανάλογα με τον βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ του microRNA (το οποίο βρίσκεται εντός του RISC) και του 3' άκρου του mRNA καθορίζεται η τύχη του mRNA-στόχου. Εάν ο υβριδισμός είναι ατελής, παρεμποδίζεται η μετάφραση του μεταγράφου, με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της αντίστοιχης πρωτεΐνης, χωρίς όμως να μειώνονται και τα επίπεδα του mRNA. Εάν ο υβριδισμός είναι σχεδόν τέλει, το μεταγράφο οδηγείται στο μονοπάτι της ενδονουκλεόλυσης. Μια πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι η αποδόμηση του μεταγράφου mRNA αποτελεί τον κύριο μηχανισμό ρύθμισης των microRNAs. Περίπου το 84% των mRNAs μετά την αναγνώρισή τους από το αντίστοιχο microRNA οδηγούνται σε διάσπαση (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Ο μηχανισμός δράσης των miRNAs (τροποποιημένο από Tomankova et al, *Involvement of microRNAs in physiological and pathological processes in the lung. Respiratory Research* 2010).

Εκτός από το βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ των microRNA και mRNA υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση των microRNA όπως η ατελής ωρίμανση των microRNA, η μεθυλίωσή τους, οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί, η γονιδιακή ενίσχυση, η χρωμοσωμική αναστροφή, η έλλειψη της πρωτεΐνης Dicer κ.α. Είναι εμφανές ότι ένα συγκεκριμένο microRNA μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση πολλών mRNA, και κάθε mRNA να ρυθμίζεται από τη δράση πολλών microRNA ταυτόχρονα (1).

1.5. miRNAs: Ανάπτυξη και διαφοροποίηση

Το γεγονός ότι τα miRNAs συναντώνται μόνο σε πολυκύτταρους και όχι σε μονοκύτταρους οργανισμούς οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είναι απαραίτητα για τη διαφοροποίηση των τύπων των ιστών και τη διατήρηση μιας συγκεκριμένης κατάστασης διαφοροποίησης. Κύτταρα αδιαφοροποίητα ή χαμηλής διαφοροποίησης δεν απαιτούν miRNAs για να επιβιώσουν. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα miRNAs είναι σημαντικά για τα αρχικά και τα τελικά στάδια ανάπτυξης των κυττάρων των σπονδυλοζώων. Για παράδειγμα, εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (EBK) ποντικού που δεν εκφράζουν το ένζυμο dicer, και επομένως δεν μπορούν να αναπτύξουν ώριμα miRNAs, είναι βιώσιμα.

Ωστόσο, αδυνατούν να διαφοροποιηθούν (2). Τα EBK τόσο του ποντικού όσο και του ανθρώπου εκφράζουν μια συγκεκριμένη ομάδα miRNAs που υποεκφράζονται κατά τη διαφοροποίηση προς εμβρυοειδή σωματίδια. Το miR-196 και πιθανόν το miR-10 εμπλέκονται στη ρύθμιση των γονιδίων *hox* που κωδικοποιούν αναπτυξιακούς μεταγραφικούς παράγοντες. Και τα δύο γονίδια βρίσκονται σε παράλληλες ομάδες των γονιδίων *hox*, εμφανίζουν πρότυπα έκφρασης που είναι παρόμοια αυτών των γονιδίων *hox*, ενώ το miR-196a ρυθμίζει αρνητικά το *hoxb8*.

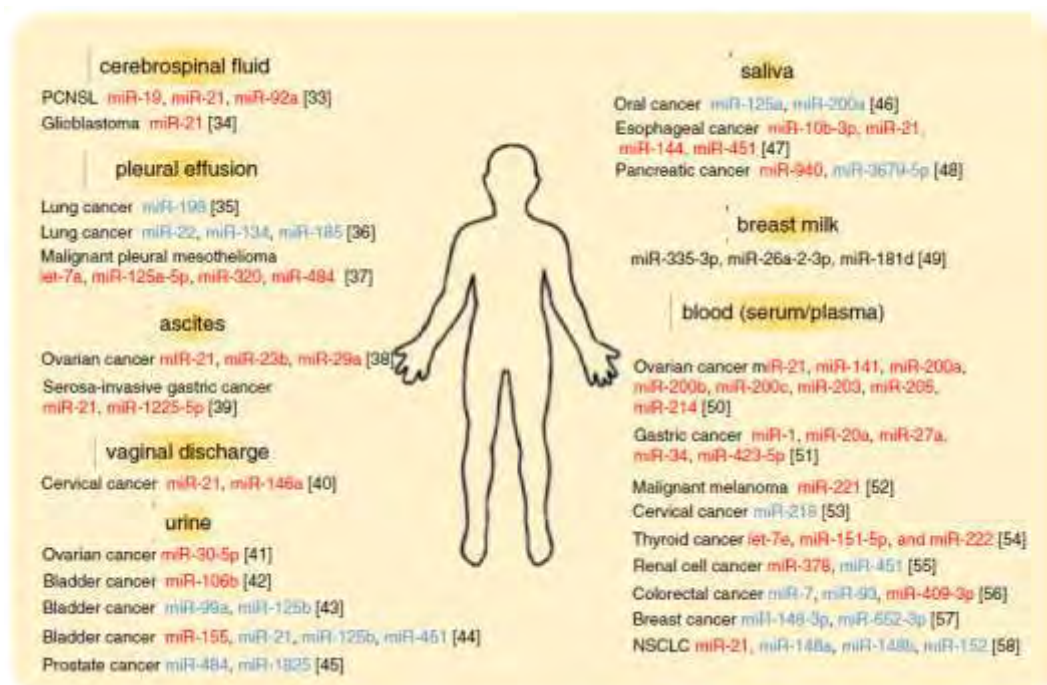
Παρά το μικρό τους μέγεθος, τα miRNAs τελικά διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο ως διακόπτες ελέγχου κατά την ανάπτυξη και την κυτταρική διαφοροποίηση. Λόγω αυτών των λειτουργιών τους, που είναι απαραίτητες σε κάθε εξειδικευμένο ιστό, η απορρύθμιση των miRNAs μπορεί να επηρεάσει τη διαφοροποίηση, που συχνά αποδιοργανώνεται ως βιολογική διαδικασία σε καρκινικά κύτταρα.

1.6. miRNAs και κυκλοφορία

Το 2008 ανακαλύφθηκαν τα πρώτα miRNAs που απομονώθηκαν από τον ορό και το πλάσμα. Στη συνέχεια βρέθηκαν και σε άλλα βιολογικά υγρά όπως στον σίελο, στα ούρα και στο μητρικό γάλα (Εικόνα 3). Ο Mitchel ήταν από τους πρώτους που μέτρησαν τα επίπεδα των miRNAs στον ορό και βρήκε ότι τα miRNAs κυκλοφορούν στο ανθρώπινο πλάσμα σε μια πολύ σταθερή δομή, προστατευμένα από την ενδογενή δράση της RNAs. Τα κυκλοφορούντα miRNAs είναι εξαιρετικά σταθερά, ακόμη και σε ακραίες συνθήκες, όπως το pH, οι υψηλές θερμοκρασίες και η αποθήκευσή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα miRNAs απελευθερώνονται από τα κύτταρα στην κυκλοφορία με συγκεκριμένο τρόπο μεταφοράς, ώστε να αποφεύγεται η αποδόμησή τους. Αυτοί είναι οι εξής:

α. ενεργής έκκριση: τα miRNAs περικλείονται σε εξωκυτταρικά μεμβρανικά κυστίδια, όπως τα εξωσώματα (30-100nm) ή μικροκυστίδια (50-1000nm). Ακόμα, κυκλοφορούν συνδεδεμένα με miRNA δεσμευτικές πρωτεΐνες, όπως είναι η AGO2 ή με μεταφορείς λιπιδίων, όπως είναι η HDL.

β. παθητική διάχυση: τα miRNAs εμπεριέχονται σε κυστίδια, όπως είναι τα αποπτωτικά σωμάτια (περίπου 4000nm), ως αποτέλεσμα της απόπτωσης.



Εικόνα 3. Τα miRNAs σε διάφορα σωματικά υγρά. Τα miRNAs ανιχνεύονται σε διάφορα σωματικά υγρά. Τα κυκλοφορούντα miRNAs αναφέρονται ως πιθανοί μη διεισδυτικοί διαγνωστικοί δείκτες για πολλούς τύπους καρκίνων. Τα miRNAs τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση σε ασθενείς σε

σύγκριση με υγιείς φαίνονται με **κόκκινο**, ενώ αυτά που παρουσιάζουν ελαττωμένη έκφραση, με **μπλε**.
PCNSL: primary central nervous system lymphoma; NSCLC: non-small cell lung cancer

1.7. miRNAs: Μέθοδοι απομόνωσης

Τα δείγματα συλλέγονται από αίμα και βιολογικά υγρά, όπως είναι το ασκитικό ή τα ούρα. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται και αποθηκεύονται στους -180 °C. Στην περίπτωση των εξωσωμικών miRNAs, τα εξωσώματα συλλέγονται χρησιμοποιώντας εμπορικά συστήματα απομόνωσης, όπως το ExoQuick. Στη συνέχεια ακολουθεί η εξαγωγή του RNA (trizol, QIAGEN) και γίνεται αλληλούχιση (next generation sequencing – NEXT) ή μικροσυστοιχίες (microarrays). Ακολουθεί QRT-PCR. Τα RNU-6B, RNU-48 και miR-16 χρησιμοποιούνται συνήθως σαν ενδογενή control, αν και τελευταία έχουν προταθεί και άλλα πιο αξιόπιστα ενδογενή control για την ποσοτικοποίηση των miRNAs.

2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

2.1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος είναι μια σύνθετη διαδικασία κατά την οποία φυσιολογικά κύτταρα, υπό την επίδραση γενετικών αλλαγών, αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται (έναρξη), να διηθούν γειτονικούς ιστούς (εξέλιξη) και τελικά να εξαπλώνονται σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος (μετάσταση). Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από αυξητικά σήματα, να μην απαντούν σε ανασταλτικά σήματα ανάπτυξης, να αποφεύγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), να υπερπηδούν τα ενδογενή όρια κυτταρικού πολλαπλασιασμού, να επάγουν και να διατηρούν την αγγειογένεση και να δημιουργούν έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων μέσα στον πρωταρχικό όγκο (3).

Τα πιο γνωστά γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Η ικανότητά μας να αναγνωρίζουμε τη συσχέτισή τους με τον καρκίνο έγινε δυνατή με την ταυτοποίηση των γενετικών και των επιγενετικών αλλαγών που επηρεάζουν τη λειτουργία των πρωτεϊνικών προϊόντων τους. Γενικά, ένας όγκος αποτελείται από έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων που διαφέρουν ως προς το σχετικό στάδιο διαφοροποίησής τους. Το εξωτερικό ενός όγκου περιλαμβάνει πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα που είναι ευαίσθητα στην ακτινοβολία και τη χημειοθεραπεία. Αυτό συμβαίνει λόγω της θέσης τους κοντά στο μη ογκογόνο μικροπεριβάλλον και την επαρκή ροή αίματος που οφείλεται στην επαγόμενη αγγειογένεση ή στην ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων. Η επόμενη προς το κέντρο του όγκου περιοχή περιλαμβάνει προγονικά κύτταρα (progenitor cells) που μπορούν να υποστούν έναν περιορισμένο αριθμό μιτωτικών διαιρέσεων για να σχηματίσουν αρκετά θυγατρικά κύτταρα. Αυτά τα θυγατρικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν στη συνέχεια σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων βάσει του μικροπεριβάλλοντός τους. Στο κέντρο του όγκου βρίσκονται τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs), που είναι τόσο δομικά όσο και λειτουργικά διακριτά από τα υπόλοιπα κύτταρα μέσα στον όγκο.

Κάθε CSCs έχει την ικανότητα να υφίσταται αυτο-ανανεωτική μίτωση, όπου το ένα ή και τα δύο από τα θυγατρικά κύτταρα διατηρεί την ταυτότητα του βλαστοκυττάρου. Το άλλο θυγατρικό κύτταρο μπορεί να γίνει προγονικό κύτταρο που υφίσταται

ορισμένους μιτωτικούς κύκλους, μέχρι να καταστεί διαφοροποιημένο καρκινικό κύτταρο (4).

2.2. miRNAs και καρκίνος

Η έναρξη και η εξέλιξη του καρκίνου σχετίζεται με την απορρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Τα γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη του καρκίνου χαρακτηρίζονται ως ογκογονίδια και ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα προϊόντα των ογκογονιδίων μπορεί να χωριστούν σε 6 κατηγορίες ανάλογα με την λειτουργία τους: μεταγραφικοί παράγοντες, αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, διαμορφωτές χρωματίνης, ρυθμιστές της απόπτωσης και μετατροπείς σήματος. Η υπερέκφραση αυτών των προϊόντων μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση του όγκου. Αντίθετα, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν ρυθμιστικό ρόλο στις βιολογικές διαδικασίες. Απώλεια ή μείωση της λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων σχετίζεται με καρκίνο (3).

Τα miRNAs είναι πολύ σημαντικά τόσο για την ανάπτυξη των βλαστοκυττάρων, όσο και για την παθογένεση του καρκίνου. Τα miRNAs δρουν τόσο ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, όσο και ως ογκογονίδια. Συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης miRNAs έχουν περιγραφεί σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Παρά το γεγονός ότι δεν είναι απολύτως σαφές αν η απορρυθμισμένη έκφραση των miRNAs είναι μια αιτία ή ένα αποτέλεσμα της καρκινικής κατάστασης, η σημασία των ρυθμιστικών αυτών μορίων στον καρκίνο είναι εμφανής (4).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η εμπλοκή των miRNAs στον καρκίνο είναι πολύ πιο εκτενής απ' ό,τι αρχικά πιστεύονταν. Αρχικά στοιχεία προήλθαν από την παρατήρηση ότι περίπου το 50% των γνωστών miRNAs βρίσκονται σε περιοχές του DNA όπου παρατηρούνται συχνά ελλείψεις ή ενισχύσεις στον καρκίνο του ανθρώπου. Περισσότερες ενδείξεις γι' αυτό προέρχονται από μελέτες έκφρασης που αφορούν ολόκληρο το γονιδίωμα.

2.3. miRNAs ως ογκοκατασταλτικά γονίδια και ως ογκογονίδια

Η πρώτη ένδειξη για εμπλοκή των miRNAs στον καρκίνο του ανθρώπου περιγράφεται στις μελέτες των Calin και συν. (5,6). Κατά την αναζήτηση κάποιου

ογκοκατασταλτικού γονιδίου στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (chronic lymphocytic leukemia, CLL) σε μια έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14, βρέθηκε ότι η μικρή περιοχή της έλλειψης κωδικοποιεί δύο miRNAs, το miR-15a και το miR-16-1. Ανάλυση της έκφρασής τους σε δείγματα CLL και φυσιολογικά CD5+ λεμφοκύτταρα αποκάλυψε ότι η υποέκφραση των δύο miRNAs που μοιράζονται ένα πρόδρομο μετάγραφο συνδυάζεται διαρκώς με την έλλειψη στην περιοχή 13q14. Αυτό υποδεικνύει τον ογκοκατασταλτικό ρόλο των miR-15a και miR-16-1. Μεταγενέστερες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την εμπλοκή των miRNAs στην παθολογία του καρκίνου του ανθρώπου.

Για τα miRNAs που δρουν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, ελαττωμένη έκφρασή τους στα καρκινικά βλαστοκύτταρα οδηγεί σε ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυτά τα miRNAs φυσιολογικά ρυθμίζουν την απόπτωση, τη διαφοροποίηση και την αυτο-ανανέωση. Ένα παράδειγμα τέτοιων μορίων είναι η οικογένεια miRNA-34 (miR-34), που αποτελείται από τα miR-34a/b/c, με υποέκφραση σε πολλούς καρκίνους. Αποκατάσταση της έκφρασης των miRNAs αυτής της οικογένειας σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου ή παγκρέατος που έχουν απαλοιφή του p53 οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση και σε απόπτωση. Τα εν λόγω αποτελέσματα δείχνουν την πιθανή σχέση του miRNA-34 με τη λειτουργία του p53.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι φυσιολογικά το p53 επάγει την είσοδο του κυττάρου σε κατάσταση ηρεμίας μέσω της ενεργοποίησης του γονιδίου-αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, p21. Παρόλα αυτά, το miR-34 μπορεί να επάγει παύση του κύκλου στην G1 φάση ανεξάρτητα από το p21 σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους. Λόγω της ρύθμισης και της λειτουργίας τους, τα μέλη της οικογένειας miR-34 έχουν πιθανόν μια σημαντική επίδραση στην ογκοκατασταλτική λειτουργία του p53.

Η οικογένεια miR-34 αναστέλλει επίσης την έκφραση των γονιδίων notch, hmg2, cdk4, cdk6, cyclin E2 και bcl-2, τα οποία εμπλέκονται στην αυτο-ανανέωση και την επιβίωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων αφού επιδρούν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση και στην επιδιόρθωση του DNA. Το bcl-2 βρίσκεται υπερεκφρασμένο στην πλειονότητα των καρκίνων του ανθρώπου και αυτή η υπερέκφρασή του συσχετίζεται με ανθεκτικότητα των καρκινικών βλαστοκυττάρων στη χημειοθεραπεία και στην ακτινοβολία. Το bcl-2 προστατεύει τα καρκινικά

κύτταρα από τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες μέσω παρεμπόδισης της απόπτωσης.

2.4. miRNAs και μηχανισμοί απορρύθμισης

Τα απορρυθμισμένα επίπεδα έκφρασης των miRNAs είναι ο κύριος μηχανισμός που προκαλεί την απώλεια ή την αυξημένη λειτουργία τους στα καρκινικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι το Myc, αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό μηχανισμό για την αλλαγή της έκφρασης των miRNAs. Γονιδιακές ανωμαλίες μπορούν επίσης να τροποποιήσουν την έκφραση των miRNAs, καθώς η υπερέκφραση των miRNAs έχει συσχετιστεί με γονιδιακή ενίσχυση ενώ η υποέκφρασή τους με χρωμοσωμικές ελλείψεις, σημειακές μεταλλάξεις και απορρυθμισμένη μεθυλίωση υποκινητών.

2.5. miRNAs και σηματοδοτικά μονοπάτια

Αρκετές μελέτες έχουν αρχίσει να καθιερώνουν τις μοριακές συσχετίσεις μεταξύ της υποέκφρασης των miRNAs και του κακοήθους μετασχηματισμού. Τα miR-15a και miR-16-1 λειτουργούν ως ρυθμιστές της αντιαποπτωτικής ογκοπρωτεΐνης BCL2 (7). Αυτά τα miRNAs κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία βρίσκονται σε χρωμοσωμικές περιοχές που παρουσιάζουν έλλειψη σε ποσοστό >50% των περιπτώσεων CLL. Στη λευχαιμική κυτταρική σειρά MEG-01, η έκφραση των δύο αυτών μορίων οδηγεί σε υποέκφραση του γονιδίου bcl2 και αυξημένη απόπτωση. Επομένως, η απώλεια της έκφρασής τους οδηγεί σε απώλεια ελέγχου της έκφρασης του bcl2 και άρα ενδεχομένως σχετίζεται με την παθολογία της CLL. Πράγματι, το bcl2 υπερεκφράζεται στη CLL. Παρόλα αυτά, αντίθετα από το οζώδες λέμφωμα, η ενεργοποίησή του συσχετίζεται με τη μετατόπιση στην περιοχή που κωδικοποιεί τα IgH. Η ενεργοποίηση του bcl2 στη CLL φαίνεται να συνδέεται, τουλάχιστον εν μέρει, με τη μειωμένη έκφραση των miR-15a και miR-16-1.

Ένας μοριακός σύνδεσμος μεταξύ της απορρύθμισης των miRNAs και του καρκίνου έχει επίσης βρεθεί για μέλη της οικογένειας let-7 που ρυθμίζουν τα ογκογονίδια ras.

Η 3'UTR περιοχή του γονιδίου ras περιέχει πολλές θέσεις πρόσδεσης των μελών της οικογένειας let-7. Η ενισχυμένη έκφραση των let-7 σε καρκινικά κύτταρα του ανθρώπου μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Ras. Καθώς το let-7

υποεκφράζεται σε αρκετούς καρκίνους του ανθρώπου, ο εν λόγω μηχανισμός θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του Ras μονοπατιού. Η σημασία της υποέκφρασης του συγκεκριμένου miRNA στον καρκίνο υποστηρίζεται από αρκετές ερευνητικές μελέτες που έδειξαν ότι το let-7 καταστέλλει την ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς A549 από καρκίνο του πνεύμονα και της κυτταρικής σειράς DLD-1 από καρκίνο του παχέος εντέρου *in vitro*.

Τα miR-125a/b υποεκφράζονται στον καρκίνο του μαστού. Αυτά τα δύο miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση των υποδοχέων των κινασών τυροσίνης ErbB2 και ErbB3. Η έκτοπη υπερέκφραση των miR-125a ή miR-125b στα κύτταρα SK-BR-3 μειώνει την ανεξάρτητη από πρόσφυση σε υπόστρωμα ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς και την ικανότητα μετανάστευσης και διήθησής τους. Η καταστολή των συγκεκριμένων καρκινικών ιδιοτήτων είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται όταν υποστεί σίγηση η σηματοδότηση από την κινάση ErbB.

2.6. miRNAs ως θεραπευτικά μόρια κατά του καρκίνου

Τα θεραπευτικά miRNAs μπορούν να εισαχθούν στα καρκινικά κύτταρα με στόχο την επιδιόρθωση των επιπέδων των απορρυθμισμένων miRNAs, προκειμένου να επιτευχθεί η αναστροφή κάποιων από τις ιδιότητες των εν λόγω κυττάρων. Αυτές οι θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύουν στη σίγηση των ογκογονιδίων μετα-μεταγραφικά, μέσω του μονοπατιού της RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi) (8). Σε αυτή τη διαδικασία, ένα μικρό μόριο RNA προκαλεί αποδόμηση ενός συμπληρωματικού του mRNA. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν τα ενδογενή miRNAs για RNAi. Η θεραπευτική RNAi τεχνολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί με δύο τρόπους, κάνοντας χρήση του συνθετικού μικρού RNA (small interfering RNA, siRNA) και της δομής μίσχου-βρόχου μικρού μήκους επάνω σε φορέα (short hairpin RNA, shRNA).

Τα siRNAs, όπως και τα miRNAs, είναι δίκλωνα μόρια μήκους 21–23 νουκλεοτιδίων, περιλαμβάνουν προεξοχές δύο νουκλεοτιδίων στα 3' άκρα και μπορούν να ενσωματωθούν άμεσα στο RISC. Τα shRNAs εισάγονται σε φορείς, επομένως συντίθενται στον πυρήνα όπως τα miRNAs. Πρόκειται για δομές μίσχου-θηλιάς, που υφίστανται την ίδια επεξεργασία με τα miRNAs, περιλαμβανομένης της πέψης από την Dicer πριν από την ενσωμάτωση στο RISC. Οι θεραπείες με μικρά μόρια RNA εμφανίζουν πρακτικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Το siRNA υφίσταται εύκολα

χημική τροποποίηση, όμως η μαζική παραγωγή αυτών των σύνθετων δομών είναι πολύ δαπανηρή. Αντίθετα, τα shRNAs είναι δύσκολο να τροποποιηθούν αλλά εύκολο να παραχθούν σε ποσότητες. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν μέθοδοι για τροποποιήσεις των shRNA που περιλαμβάνουν αλλαγή της ενσωματωμένης αλληλουχίας, μεταβολή της ρύθμισης του υποκινητή, χρήση διαφορετικών πλασμιδιακών και ιικών φορέων για την επιμόλυνση των κυττάρων και ρύθμιση ή επαγωγή της έκφρασης των shRNAs. Τόσο τα siRNAs όσο και τα shRNAs παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα *in vivo*.

Η αποτελεσματικότητα των siRNAs και των shRNAs εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων, όπως η παράκαμψη της ανοσιακής απόκρισης, η αναποτελεσματικότητα της σίγησης των μορίων-στόχων και οι πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες, λόγω του περίπλοκου και όχι πλήρως αποσαφηνισμένου ρόλου που διαδραματίζουν τα εκάστοτε μετάγραφα-στόχοι στα βιοχημικά μονοπάτια. Τα siRNAs με μήκος μεγαλύτερο από 29–30 νουκλεοτίδια επάγουν μια ανοσιακή απόκριση με ιντερφερόνη ανάλογη με αυτή που προκαλεί το δίκλωνο RNA (dsRNA). Το φαινόμενο περιορίζεται με μείωση του μήκους του siRNA ή με χημική τροποποίηση. Τόσο τα siRNAs όσο και τα shRNAs ενεργοποιούν τους υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) και την ανοσιακή απόκριση. Αυτό μπορεί να εξαλειφθεί με τη χρήση μικρών πλασμιδιακών φορέων ή μη μεθυλιωμένων πλασμιδιακών φορέων χωρίς CpG. Από την άλλη πλευρά, θεραπείες που βασίζονται στο RNAi έχουν πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση οδηγώντας σε μη επιθυμητούς φαινότυπους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τέτοια μικρά RNAs μπορούν να προσδεθούν σε μετάγραφα mRNAs με μερική συμπληρωματικότητα. Τα siRNAs, όπως και τα miRNAs, έχουν μια αλληλουχία seed region (SR) από το 2ο–8ο νουκλεοτίδιο που είναι συμπληρωματικό με το 3' άκρο του mRNA. Ως antago-miRs ή AMOs χαρακτηρίζονται μόρια νουκλεϊκών οξέων που εμφανίζουν συμπληρωματικότητα προς συγκεκριμένα miRNAs και χρησιμοποιούνται προκειμένου να ελαττωθεί η έκφραση αυτών των miRNAs και, επομένως, και η δράση τους.

Προς το παρόν, δεν υπάρχουν αναφορές για την κλινική χρήση των miRNAs. Παρ' όλα αυτά, η αύξηση των μελετών για *in vivo* χρήση siRNAs και shRNAs για τη σίγηση γονιδίων-στόχων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη τεχνικών χρήσιμων στην καθοδήγηση των miRNAs στα κατάλληλα κύτταρα.

3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

3.1. Εισαγωγή

Οι ωοθήκες αποτελούν το γεννητικό αδένα της γυναίκας. Έχουν σχήμα ελλειψοειδές και αποπλατυσμένο. Το μήκος τους είναι περίπου 3-6 εκ. και το πλάτος τους 1,5-3,5 εκ. Αποτελούνται από τον άνω ή σαλπινγικό πόλο, που έρχεται σε επαφή με τον κώδωνα και τους κροσσούς της αντίστοιχης σάλπιγγας και τον κάτω ή μητρικό πόλο που συνδέεται με το κέρας της μήτρας με τον ίδιο σύνδεσμο της ωοθήκης. Κάθε ωοθήκη αποτελείται από τη φλοιώδη και τη μυελώδη μοίρα και καλύπτεται από μια μονήρη στοιβάδα αποπλατυσμένου κυβοειδούς έως χαμηλού κυλινδρικού επιθηλίου, που συνδέεται με το περιτόναιο κατά το μεσοωθήκιο. Η φλοιώδης μοίρα βρίσκεται στην περιφέρεια του αδένα και περιέχει τα ωοθυλάκια. Η μυελώδης μοίρα βρίσκεται στο κέντρο του αδένα και αποτελείται από συνδετικό ιστό, μυϊκές ίνες και αγγεία. Η αιμάτωση της ωοθήκης γίνεται από τις ωοθηκικές αρτηρίες, κλάδους της κοιλιακής αορτής και η νεύρωσή της από το ωοθηκικό και το μητροκολπικό πλέγμα (9).

Τα νεοπλάσματα της ωοθήκης μπορεί να προέρχονται από οποιοδήποτε από τα στοιχεία που αποτελούν μια ώριμη ωοθήκη δηλαδή από το επιθήλιο εκ του οποίου προέρχεται το 90% των πρωτοπαθών όγκων, το στρώμα και τα γεννητικά κύτταρα. Εκτός αυτών στις ωοθήκες μερικές φορές αναπτύσσονται και μεταστατικοί όγκοι από το ενδομήτριο, το γαστρεντερικό σύστημα και τους μαστούς (10).

3.2. Επιδημιολογία

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι πιο συχνός στους λευκούς από ότι στους αφροαμερικανούς (12.8 συγκριτικά με 9.8 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες ετησίως). Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών (ΕΚΩ) μπορεί να εμφανιστεί ακόμα και από την ηλικία των 15 ετών, με μέση ηλικία εμφάνισης τα 63 έτη, ενώ οι περισσότερες περιπτώσεις γυναικών που διαγιγνώσκονται με ΕΚΩ είναι ηλικίας 55-64 ετών. Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου, ο καρκίνος των ωοθηκών κατέχει τη 17^η θέση καρκίνου στις γυναίκες, αλλά είναι η 5^η αιτία θανάτων από καρκίνο στις γυναίκες (11).

Η παγκόσμια επίπτωσή του παρουσιάζει μεγάλη γεωγραφική διακύμανση. Οι αναπτυσσόμενες χώρες έχουν την μικρότερη επίπτωση. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση,

εκτιμάται ότι το 2008, διαγνώστηκαν συνολικά 45.300 γυναίκες με καρκίνο της ωοθήκης. Η συνολική πιθανότητα για μία γυναίκα στην Ευρωπαϊκή Ένωση να αναπτύξει καρκίνο των ωοθηκών κατά τη διάρκεια της ζωής της κυμαίνεται μεταξύ 0,64% και 1.6% (12).

3.3. Παράγοντες κινδύνου

Μέχρι σήμερα, η αιτία του καρκίνου της ωοθήκης δεν είναι απόλυτα κατανοητή, αλλά αρκετοί παράγοντες κινδύνου έχουν ταυτοποιηθεί. Οι παράγοντες κινδύνου είναι οι εξής:

- **Αναπαραγωγικοί παράγοντες.** Ο παράγοντας κινδύνου για εμφάνιση επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών είναι μεγαλύτερος στις άτοκες γυναίκες και πιθανώς σε αυτές με πρόωρη εμμηναρχή ή καθυστερημένη εμμηνόπαυση. Οι γυναίκες που τεκνοποίησαν έχουν 50% μικρότερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο των ωοθηκών σε σχέση με τις άτοκες γυναίκες. Η χρήση αντισυλληπτικών από το στόμα μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών σημαντικά. Αυτοί οι παράγοντες ενισχύουν τη θεωρία ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών σχετίζεται άμεσα με την ωορρηξία, καθώς η επαναλαμβανόμενη διέγερση των ωοθηκικών ιστών κατά τη διάρκεια των κύκλων ωορρηξίας, αυξάνει τον κίνδυνο βλάβης του DNA των κυττάρων, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο.
- **Γενετικοί παράγοντες.** Το οικογενειακό ιστορικό είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών στο γενικό πληθυσμό είναι 1.6%. Αυτός αυξάνεται σε 4-5% όταν ένα πρώτου βαθμού συγγένειας μέλος νοσεί και σε 7% όταν δύο συγγενείς νοσούν. Η ανάλυση του γονιδιώματος μέσω του δικτύου Cancer Genome Atlas Research Network αποκάλυψε ότι ο υψηλού βαθμού ορώδης καρκίνος των ωοθηκών χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις του TP53 σχεδόν σε όλους τους όγκους. Επίσης βρέθηκαν στατιστικά επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις σε 9 ακόμα γονίδια, τα NF1, BRCA1, BRCA2, RB1 και CDK12, καθώς και 113 σημαντικές αποκλίσεις στον αριθμό αντιγράφων του DNA και μεθυλίωσης του υποκινητή, που αφορούσαν 168 γονίδια. Αποκαλύφθηκαν, επίσης, παθολογικοί ομόλογοι ανασυνδυασμοί

στους μισούς περίπου όγκους και ότι τα μονοπάτια NOTCH και FOXM1 εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του ορώδους καρκίνου των ωοθηκών. Τουλάχιστον δύο σύνδρομα κληρονομικού καρκίνου των ωοθηκών έχουν ταυτοποιηθεί και αφορούν είτε μεταλλάξεις των γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού (BRCA1 και BRCA2) ή σπανιότερα γονίδια που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch II. Περίπου ένας στους 4000 ανθρώπους του γενικού πληθυσμού είναι φορέας μετάλλαξης BRCA1. Οι φορείς του BRCA1 γονιδίου έχουν 50-85% κίνδυνο να παρουσιάσουν καρκίνο του μαστού και 15-45% κίνδυνο να αναπτύξουν ΕΚΩ. Αυτοί με BRCA2 έχουν 50-85% κίνδυνο να παρουσιάσουν καρκίνο του μαστού και 10-20% κίνδυνο να αναπτύξουν ΕΚΩ. Μεταλλάξεις της γεννητικής σειράς των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 συνδέονται με υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου των μαστών και των ωοθηκών. Παρόλα αυτά, σε ανάλυση μιας κοινής γενετικής παραλλαγής στην περιοχή 9p22.2, φάνηκε ότι ο κίνδυνος για ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών ήταν ελαττωμένος σε φορείς της μετάλλαξης BRCA1 ή BRCA2.

Οικογένειες με σύνδρομο Lynch II χαρακτηρίζονται από υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη νεοπλασιών, όπως καρκίνος του ενδομητρίου, στομάχου, λεπτού εντέρου, μαστού, ενδομητρίου, παγκρέατος και ωοθηκών. Αυτό το σύνδρομο προκαλείται από μεταλλάξεις στα επιδιορθωτικά γονίδια, όπως τα MSH2, MLH1, PMS1 και PMS2.

Κάποιοι πληθυσμοί έχουν μεγαλύτερο ποσοστό μετάλλαξης BRCA1 και BRCA2 (Εβραίοι Ασkenάζι). Οικογένειες με δύο πρώτου βαθμού συγγενείς που νόσησαν από ΕΚΩ προεμμηνοπαυσιακά, έχουν αυξημένη πιθανότητα μετάλλαξης των γονιδίων BRCA1 ή BRCA2 έως και 40%. Η πιθανότητα ελαττώνεται όταν η νόσος εμφανίζεται μετεμμηνοπαυσιακά.

- **Προηγούμενη ορμονική θεραπεία.** Μελέτες έχουν δείξει ότι οι θεραπείες ορμονικής υποκατάστασης με οιστρογόνα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, όταν δίνονται για περιόδους μεγαλύτερες από 10 χρόνια, μπορεί να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών. Τα στοιχεία, όμως, θα πρέπει να επιβεβαιωθούν.
- **Λοιποί παράγοντες.** Η χρήση του ταλκ στη γεννητική περιοχή είναι ύποπτη ότι σχετίζεται με την ανάπτυξη του καρκίνου των ωοθηκών. Το ταλκ μπορεί να

φτάσει στις ωοθήκες μέσω του αναπαραγωγικού σωλήνα και να ερεθίσει το ωοθηκικό επιθήλιο. Ωστόσο τα στοιχεία για τη συσχέτιση της χρήσης του ταλκ με τον ωοθηκικό καρκίνο είναι ελλιπή.

3.4. Παθοφυσιολογία

Σύμφωνα με τις επικρατούσες θεωρίες, ο καρκίνος των ωοθηκών ξεκινάει από την αποδιαφοροποίηση των κυττάρων περιβάλλουν την ωοθήκη. Κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας, αυτά τα κύτταρα μπορούν να ενσωματωθούν στην ωοθήκη, όπου και πολλαπλασιάζονται. Παρόλα αυτά, νέα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η πλειοψηφία αυτών των όγκων έχει την προέλευση της στους κροσσούς της σάλπιγγας (13). Οι όγκοι των ωοθηκών διακρίνονται σε επιθηλιακούς, που αποτελούν περίπου το 90% των όγκων, ενώ το υπόλοιπο 10% περιλαμβάνει τους εξής ιστολογικούς τύπους: εκ γεννητικών κυττάρων, εκ γοναδικού στρώματος, μεσεγχυματικούς και μεταστατικούς (Πίνακας 1).

ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΙ ΟΓΚΟΙ (85-90%)	ΕΚ ΓΟΝΑΔΙΚΟΥ ΣΤΡΩΜΑΤΟΣ
<ul style="list-style-type: none"> • Ορώδεις – 42% • Βλεννώδεις – 12% • Ενδομητριοειδείς – 15% • Εκ διαυγών κυττάρων – 6% • Όγκοι Brenner • Αδιαφοροποίητα καρκινώματα – 17% • Καρκινώματα και μεικτοί μεσοδερματικοί όγκοι • Όγκοι οριακής κακοήθειας 	<ul style="list-style-type: none"> • Κοκκιοκυτταρικός όγκος • Θήκωμα • Όγκος Sertoli Leydig • Αρρενοβλάστωμα • Γυνανδροβλάστωμα • Εκ λιπώδων κυττάρων
ΕΚ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (GERMCELLS)	ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ
<ul style="list-style-type: none"> • Τεράτωμα • Δυγερμίνωμα • Εμβρυονικό καρκίνωμα • Χοριοκαρκίνωμα • Γοναδοβλάστωμα • Όγκος ενδοδερμικού κόλπου 	<ul style="list-style-type: none"> • Ίνωμα, λειομύωμα, λίπωμα, αιμαγγείωμα • Λέμφωμα • Σάρκωμα
ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ	
<ul style="list-style-type: none"> • Γαστρεντερικού (Krukemberg) • Μαστού • Ενδομητρίου • Λέμφωμα 	

Πίνακας 1. Ταξινόμηση ωοθηκικών όγκων.

Ο ΕΚΩ αποτελεί περίπου το 90% των κακοήθων όγκων των ωοθηκών. Ιστογενετικά προέρχεται από το βλαστικό ή επιπολής επιθήλιο των ωοθηκών, που αποτελεί εξειδικευμένο τμήμα της μεσοθηλιακής επικάλυψης (περιτόναιο) της σπλαχνικής κοιλότητας. Από τη μεσοθηλιακή αυτή επικάλυψη (μεσόδερμα) σχηματίζονται και οι πόροι του Müller, εκ των οποίων προέρχονται οι σάλπιγγες, η μήτρα και ο κόλπος. Έτσι, όταν το βλαστικό ή επιπολής επιθήλιο των ωοθηκών δημιουργεί όγκους, αυτοί μπορεί να είναι ορώδεις (όπως των σαλπίγγων), βλεννώδεις (όπως του ενδοτραχήλου), ενδομητριοειδείς (όπως του ενδομητρίου) και διαυγοκυτταρικοί (με κύτταρα πλούσια σε γλυκογόνο όπως οι αδένες του ενδομητρίου στην κύηση). Οι παραπάνω ιστολογικοί υπότυποι διακρίνονται σε χαμηλής, υψηλής ή οριακής κακοήθειας. Από τους όγκους αυτούς ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι όγκοι οριακής κακοήθειας των ωοθηκών. Εμφανίζουν ιστολογικά χαρακτηριστικά κακοήθειας αλλά έχουν κλινικά πολύ καλή πρόγνωση. Παρά το ότι ταξινομούνται ανάμεσα στους καλοήθεις και τους αμιγώς κακοήθεις όγκους, δεν είναι ξεκάθαρο εάν αποτελούν ενδιάμεσο στάδιο στη διαδικασία της καρκινογένεσης ή εάν αποτελούν ανεξάρτητη οντότητα. Αυτό που τους χαρακτηρίζει ιστολογικά είναι η μη διήθηση του στρώματος της ωοθήκης (9).

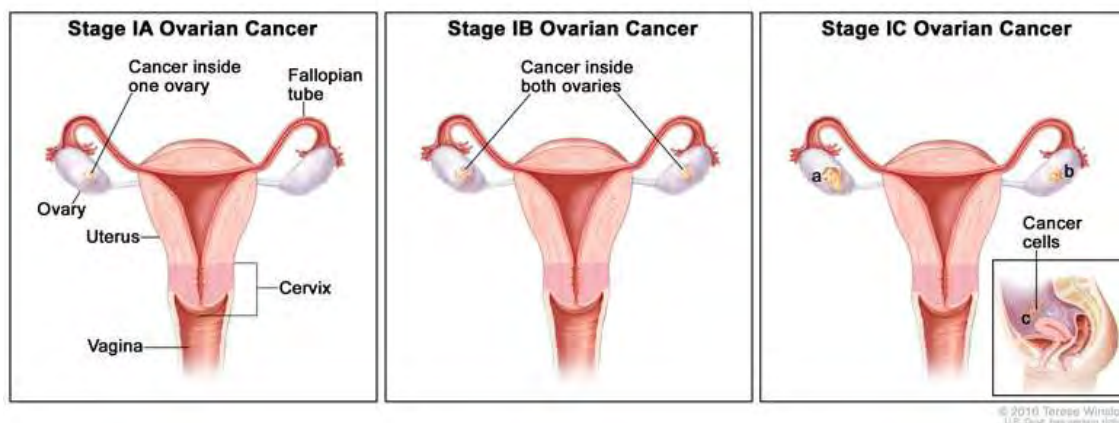
3.5. Διάγνωση

Ο καρκίνος των ωοθηκών δεν έχει χαρακτηριστική συμπτωματολογία. Στα αρχικά στάδια συνήθως αποτελεί τυχαίο εύρημα μιας γυναικολογικής εξέτασης. Μόνο όταν αυξηθεί σημαντικά το μέγεθος του όγκου προκαλούνται ήπιες και άτυπες γαστρεντερικές εκδηλώσεις (πρώιμος κορεσμός, δυσπεψία, δυσκοιλιότητα). Στα προχωρημένα πλέον στάδια λόγω της μεγέθυνσης του όγκου και των ενδοπεριτοναϊκών μεταστάσεων του αλλά και λόγω της ανάπτυξης του ασκίτη, τα προαναφερθέντα συμπτώματα μπορεί να είναι πιο έντονα και να περιλαμβάνουν διάταση της κοιλίας, ναυτία, ανορεξία και καταβολή δυνάμεων (9).

Η διάγνωση βασίζεται στην κλινική εξέταση, στις απεικονιστικές μεθόδους, όπως είναι η υπερηχογραφία, η έγχρωμη Doppler υπερηχογραφία, η μαγνητική τομογραφία και στη διενέργεια εργαστηριακών εξετάσεων (CA-125, hCG, AFP και LDH). Ο CA-125 είναι ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος βιοδείκτης στον καρκίνο των ωοθηκών.

Η τελική διάγνωση τίθεται χειρουργικά με την ιστοπαθολογική εξέταση και τη σταδιοποίηση του όγκου.

3.6. Σταδιοποίηση



Εικόνα 4. Ωοθήκη. Ανατομία της ωοθήκης και στάδια του καρκίνου των ωοθηκών.

Ο καρκίνος των ωοθηκών επεκτείνεται κατά συνέχεια ιστού στα παρακείμενα όργανα, με αποβολίδωση κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα και εμφύτευση αυτών λεμφογενώς και αιματογενώς. Η σταδιοποίηση του καρκίνου των ωοθηκών είναι χειρουργική και χρησιμοποιείται η κατάταξη κυρίως κατά FIGO (Πίνακας 2).

Στάδιο	Περιγραφή
I	Νόσος περιορισμένη στις ωοθήκες
Ia	Νόσος περιορισμένη στη μία ωοθήκη, χωρίς ασκτικό υγρό με κακοήγη κύτταρα, χωρίς παρουσία του όγκου στις εξωτερικές επιφάνειες, με άθικτη κάψα
Ib	Νόσος περιορισμένη στις δύο ωοθήκες, χωρίς ασκτικό υγρό με κακοήγη κύτταρα, χωρίς παρουσία του όγκου στις εξωτερικές επιφάνειες, με άθικτες κάψες
Iγ	Όγκος Ia ή Ib αλλά με παρουσία στην επιφάνεια της μιας ή και των δύο ωοθηκών ή με ρήξη της κάψας ή με ασκίτη θετικό για κακοήγη κύτταρα ή θετικά περιτοναϊκά εκπλύματα
II	Ανάπτυξη του όγκου στη μια ή και τις δύο ωοθήκες με επέκταση στην πύελο
IIa	Επέκταση ή/και μετάσταση στη μήτρα και/ή τις σάλπιγγες
IIβ	Επέκταση σε άλλα πυελικά όργανα
IIγ	IIa ή IIβ αλλά με παρουσία όγκου στην επιφάνεια της μιας ή και των δύο ωοθηκών ή με ρήξη της κάψας ή με ασκίτη θετικό για κακοήγη κύτταρα ή θετικά περιτοναϊκά εκπλύματα
III	Ανάπτυξη του όγκου στη μια ή και τις δύο ωοθήκες με περιτοναϊκές εμφυτεύσεις εκτός πυέλου και/ή θετικούς πυελικούς ή παραορτικούς

	λεμφαδένες. Επιφανειακές εντοπίσεις ήπατος. Επίσης νόσος που περιορίζεται στην πύελο αλλά ιστολογικά τεκμηριώνεται επέκταση στο λεπτό έντερο ή το επίπλουν
IIIα	Όγκος αδρά περιοριζόμενος στην ελάχιστονα πύελο με αρνητικούς λεμφαδένες, αλλά με ιστολογικά επιβεβαιωμένη μικροσκοπική διασπορά σε περιτοναϊκές επιφάνειες
IIIβ	Όγκος στη μία ή και τις δύο ωοθήκες με ιστολογικά επιβεβαιωμένες μακροσκοπικές εμφυτεύσεις σε περιτοναϊκές επιφάνειες που καμία δεν υπερβαίνει τα 2 εκατοστά σε διάμετρο, με αρνητικούς λεμφαδένες
IIIγ	Περιτοναϊκές εμφυτεύσεις μεγαλύτερες από 2 εκατοστά σε διάμετρο και/ή θετικοί πυελικοί ή παραορτικοί λεμφαδένες
IV	Όγκος στη μία ή και τις δύο ωοθήκες με απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αν υπάρχει πλευριτική συλλογή πρέπει να τεκμηριωθεί κυτταρολογικώς για να σταδιοποιηθεί ως στάδιο IV. Παρεγχυματική νόσος ήπατος

Πίνακας 2. Σταδιοποίηση του καρκίνου των ωοθηκών κατά FIGO.

3.7. Πρόγνωση

Η πρόγνωση εξαρτάται από τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, τους ιστοπαθολογικούς χαρακτήρες του νεοπλάσματος και τη σταδιοποίηση του όγκου, τη θεραπεία, το μέγεθος της υπολειπόμενης νόσου και τη γενική κατάσταση του ασθενούς.

Παρά το γεγονός ότι η 5ετής επιβίωση ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών έχει βελτιωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, η πρόγνωση του καρκίνου των ωοθηκών δεν είναι ικανοποιητική, με ποσοστό 5ετούς επιβίωσης 46%. Η πρόγνωση είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη σταδιοποίηση του καρκίνου ωοθηκών (FIGO). Τα ποσοστά των γυναικών που εμφανίζουν καρκίνο των ωοθηκών σταδίου I, II, III, IV είναι 20%, 5%, 58% και 17%, αντίστοιχα. Η 5ετής επιβίωση του Ε.Κ.Ω. σταδιοποιημένου κατά FIGO έχει ως εξής:

- Στάδιο Ia - 87%
- Στάδιο Ib - 71%
- Στάδιο Ic - 79%
- Στάδιο IIa - 67%
- Στάδιο IIb - 55%
- Στάδιο IIc - 57%
- Στάδιο IIIa - 41%
- Στάδιο IIIb - 25%

- Στάδιο IIIγ - 23%
- Στάδιο IV - 11%

3.8. Θεραπεία

Κυρίαρχο ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών έχει η χειρουργική επέμβαση. Στόχος είναι η ριζικότερη κυτταρομειωτική επέμβαση (εξαίρεση όλων ή των περισσότερων καρκινικών εντοπίσεων), καθώς η υπολειπόμενη νόσος έχει αρνητική επίδραση στην επιβίωση. Η χειρουργική επέμβαση τεκμηριώνει τη διάγνωση, σταδιοποιεί τη νόσο, οδηγεί στην πρωτοπαθή κυτταρομείωση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ενδιάμεση ή δευτεροπαθή κυτταρομείωση. Η επέμβαση μπορεί να περιλαμβάνει ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων, υπερκολική επιπλεκτομή, λεμφαδενική δειγματοληψία και ογκομείωση.

Μετεγχειρητική χημειοθεραπεία ενδείκνυται σε όλους τους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, εκτός από τους ασθενείς σταδίου I, με χαρακτηριστικά χαμηλού κινδύνου.

Περιλαμβάνει τη συστηματική χημειοθεραπεία, την ακτινική θεραπεία της πυέλου και όλης της κοιλιακής χώρας, την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση χημειοθεραπευτικών ή ραδιοϊσότοπων και την ορμονοθεραπεία. Εξ αυτών κυρίαρχη είναι η θέση της συστηματικής χημειοθεραπείας είτε σαν μονοθεραπεία είτε σαν συνδυασμός φαρμάκων. Το χημειοθεραπευτικό σχήμα εκλογής σήμερα για την αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών είναι η πακλιταξέλη (paclitaxel) και η καρβοπλατίνη (carboplatin).

4. miRNAs & ΜΟΡΙΑΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ο καρκίνος των ωοθηκών παρουσιάζει αξιοσημείωτη ετερογένεια σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο και μπορεί να διαχωριστεί σε τύπου I – χαμηλού βαθμού κακοήθειας και τύπου II – υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνο, με βάση την ιστολογική εικόνα και το μοριακό προφίλ.

Οι υψηλής κακοήθειας καρκίνοι χαρακτηρίζονται από πολλαπλές αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων, από μεταλλάξεις γονιδίων, καθώς και από επιγενετικές αλλαγές.

4.1. Μοριακό προφίλ υψηλού βαθμού κακοήθειας κακοήθειας ΕΚΩ

4.1.1. miRNAs και μεταβολές του αριθμού των αντιγράφων

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και οι αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων είναι συνήθεις στους υψηλού βαθμού κακοήθειας, ορώδεις καρκίνους των ωοθηκών (14).

50% των miRNAs βρίσκονται σε εύθραυστα σημεία των χρωμοσωμάτων και σε περιοχές ελλειμάτων, διπλασιασμών ή συνήθων σημείων θραύσης που σχετίζονται με διάφορους καρκίνους (15). Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που περιλαμβάνουν miRNAs δεν είναι τυχαία γεγονότα. Ακόμα αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων του DNA μπορεί να ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την απορρύθμιση των miRNAs σε καρκίνους των ωοθηκών. Μέσω μελετών υψηλής ανάλυσης γενωμικής υβριδοποίησης με χρήση συστοιχιών σε 227 ανθρώπινα δείγματα καρκίνων, μελετητές βρήκαν ότι κάποιοι γενετικοί τόποι που περιέχουν γονίδια miRNAs συχνά μεταβάλλονταν σε ανθρώπινους καρκίνους ωοθηκών, σε καρκίνους μαστού και σε μελανώματα. 26 miRNAs σχετίζονταν με αύξηση και 15 με απώλεια του αριθμού των αντιγράφων και στους τρεις καρκινικούς τύπους (16). Μείωση των επιπέδων οκτώ πιθανών ογκοκατασταλτικών miRNAs (miR-337, miR-376a, miR-376b, miR-432, miR-368, miR-495, miR-377 και miR-410) που εντοπίζεται επάνω σε έλλειψη στο χρωμόσωμα 14 συσχετίζεται με χαμηλά ποσοστά επιβίωσης στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών (17). Η θετική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των αντιγράφων και της απορρύθμισης των πέντε miRNAs έχει επανειλημμένα επιβεβαιωθεί σε έναν πλήθος μελετών, συμπεριλαμβανομένων των miR-31 στο

9p21, miR-93 στο 7q22.1, miR-182 στο 7q32.2 και miR-200b/429 στο 1p36 (16,18,19,20).

Στα δεδομένα από το TCGA, (The Cancer Genome Atlas), έχουν βρεθεί διάφορα miRNAs σε ελλειμματικές ή διπλασιασμένες γενωμικές περιοχές (21). Η μείωση του let-7b σχετίζεται με ημιζυγωτική γενωμική απώλεια (86%) και ομοζυγωτικό έλλειμμα (7%). Μέλη της οικογένειας miR-30 που εντοπίζονται σε δύο διαφορετικούς εστιακά διπλασιασμένους τόπους είναι τα πιο συχνά διπλασιασμένα miRNAs και ο αριθμός αντιγράφων τους συσχετίζεται με την έκφραση των ώριμων miRNAs (21). Οι Creighton και συν. υπολόγισαν τη συσχέτιση μεταξύ των miRNAs και την έκφραση του γονιδίου που τα φιλοξενεί και βρήκαν ότι το 52% αυτών των ζευγαριών εμφάνιζαν υψηλή συσχέτιση. Τα Cyclin E1 (CCNE1), Notch3, HBXAP/ Rsf-1, AKT2 και PIK3CA αποτελούν κάποια από τα πιο συχνά διπλασιασμένα γονίδια σε υψηλού βαθμού κακοήθειας, ορώδη καρκίνο των ωοθηκών (22). Κάτω από το Notch3 βρέθηκε το miR-23a που σταθερά βρίσκεται αυξημένο σε καρκίνους των ωοθηκών σε διάφορες μελέτες. Το miR-641 τοποθετείται κοντά στο AKT2, αλλά δεν υπερεκφράζεται σε υψηλού βαθμού κακοήθειας ορώδεις καρκίνους των ωοθηκών.

4.1.2. miRNAs και επιγενετικές αλλαγές

Οι επιγενετικές αλλαγές είναι ένας σημαντικός μηχανισμός απορρύθμισης των miRNAs. Εκτός από τον αριθμό των αντιγράφων, βρέθηκε ότι τα miR-21, miR-203 και miR-205 υπερεκφράζονται σε καρκίνους των ωοθηκών και ότι τα επίπεδα έκφρασής τους αυξάνονται περαιτέρω στην καρκινική κυτταρική σειρά OVCAR3 με επώαση με τον απομεθυλιωτικό παράγοντα 5-αζα-2-δεοξυκυτιδίνη (5-AZA), υποδεικνύοντας ότι πιθανά αυτά τα miRNAs ρυθμίζονται με μεθυλίωση (23). Επιστήμονες χορήγησαν 5-AZA και 4-φαινυλοβουτυρικό οξύ (αναστολέας των ιστονικών αποακετυλασών) σε 5 καρκινικές κυτταρικές σειρές ωοθηκών και βρήκαν ότι 16 από τα 44 miRNAs (36.4%) που μειώνονται σε προχωρημένου σταδίου καρκίνο των ωοθηκών μπορούν να αποκατασταθούν με αυτά τα φάρμακα (19). Πρόσφατα επιβεβαιώθηκε η υπερμεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών miR-34a και miR-34bc, σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, με μειωμένο miR-34.

4.1.3. TP53

Μετάλλαξη στο γονίδιο TP53 έχει βρεθεί σε ποσοστό, τουλάχιστον 96% υψηλού βαθμού κακοήθειας ορώδεις καρκίνους των ωοθηκών και μπορεί να ρυθμίζει τα miRNAs. Καθώς η οικογένεια miR-34 ρυθμίζεται θετικά από άγριου τύπου TP53, η έκφραση του miR-34a βρέθηκε μειωμένη σε ποσοστό 100% των καρκίνων με μετάλλαξη του TP53 ενώ των 34b και 34c στο 72% των καρκίνων με μετάλλαξη του TP53 (24). Μετάλλαξη του TP53 μπορεί επίσης να ευθύνεται για υποέκφραση του miR-31 (18).

4.1.4. BRCA1 και BRCA2

Περίπου 15% των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών έχουν ισχυρό οικογενειακό ιστορικό μεταλλάξεων στη γεννητική σειρά των BRCA1 και BRCA2, γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA ή σε σπάνιες περιπτώσεις του TP53 (25). Ενώ μεταλλάξεις των BRCA1 και BRCA2 μπορεί να επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων, τουλάχιστον σε μία μελέτη βρέθηκε ότι ένα ποσοστό υψηλού βαθμού ορώδων καρκίνων των ωοθηκών παρουσιάζει ανωμαλίες σχετιζόμενες με τα BRCA1/2 απουσία μετάλλαξης. Τα miRNAs μπορούν να μειώνουν την έκφραση άγριου τύπου BRCA1. Ένας πολυμορφισμός G προς C (rs2910164) στο πρόδρομο miR-146a χαλάει τη συμπληρωματικότητα των βάσεων στην περιοχή του στελέχους (stem). Αυτό το αλληλόμορφο μπορεί να αυξήσει την έκφραση του miR-146a καθώς και την ικανότητά του να προσδένεται στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'UTR) του BRCA1. Έτσι, το miR-146a μπορεί να προσδεθεί στις 3'UTRs των BRCA1 και BRCA2 και πιθανώς να τροποποιεί την έκφρασή τους. Ο πολυμορφισμός rs2910164 στο miR-146a μπορεί να επηρεάζει την ηλικία εμφάνισης καρκίνου. Ασθενείς που έφεραν ένα τουλάχιστον αλληλίο miR-146 με πολυμορφισμό, διαγνώστηκαν σε νεαρότερη ηλικία απ' ότι γυναίκες χωρίς αυτό το αλληλόμορφο (26).

4.2. Μοριακό προφίλ χαμηλού βαθμού κακοήθειας ΕΚΩ

Μόνο το 10% των καρκίνων των ωοθηκών είναι χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Κλινικά, αυτοί οι καρκίνοι μεγαλώνουν αργά και παρουσιάζονται σε αρχικό στάδιο, αλλά δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία με πλατίνα και ταξάνη όσο καλά ανταποκρίνονται οι υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνοι (29). Περισσότεροι από τους μισούς, χαμηλού βαθμού κακοήθειας, ορώδεις καρκίνοι των ωοθηκών

σχετίζονται με μεταλλάξεις του KRAS ενώ μικρότερα ποσοστά παρουσιάζουν μεταλλάξεις των BRAF, PTEN και PIK3CA. Λιγότερα από 20 miRNAs διαφέρουν στην έκφραση μεταξύ των υψηλού και χαμηλού βαθμού κακοήθειας ορικών καρκίνων των ωοθηκών. Αναλύοντας το προφίλ των miRNAs στη συλλογή NCI-60 που περιέχει 60 ανθρώπινες καρκινικές σειρές, οι Patnaik και συν. βρήκαν ότι μετάλλαξη των BRAF και PTEN επηρεάζει την έκφραση των miRNAs αλλά μετάλλαξη του KRAS δεν την επηρεάζει (30). Μεταξύ των miRNAs που σχετίζονται με μεταλλαγμένο BRAF, 4 miRNAs (miR-509-3p, miR-30d, miR-30b-3p και miR-30b) έχουν αναφερθεί ότι αυξάνονται σε χαμηλού βαθμού κακοήθειας ορώδεις καρκίνους των ωοθηκών, σε σύγκριση με κανονικές σάλπιγγες. Η μετάλλαξη BRAFv600E μπορεί να προκαλεί αύξηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της MAPK, να οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ώριμων miRNAs και να αυξάνει την επεξεργασία των miRNAs σε μη διαφοροποιημένο πολυμορφικό σάρκωμα, αλλά ο ρόλος της στους χαμηλού βαθμού κακοήθειας, ορώδεις καρκίνους των ωοθηκών μένει να διερευνηθεί. Μετάλλαξη του PTEN είναι υπεύθυνη για τη μείωση των miR-29b και miR-769-3p σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενώ μετάλλαξη του PIK3CA δεν έχει ακόμα συνδεθεί με κάποια αλλαγή στη έκφραση των miRNAs.

4.3. miRNAs και γονίδια στόχοι

Η δράση των miRNAs καθορίζεται από τα γονίδια και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζονται από κάθε miRNA. Απορρύθμιση των miRNAs και των προβλεπόμενων στόχων τους τείνουν να αντι-συσχετίζονται στη γονιδιακή έκφραση του καρκίνου των ωοθηκών.

Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα γονιδιακής έκφρασης σε καρκίνο των ωοθηκών και συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs και των συνολικών μεταγράφων με σκοπό να βρεθούν γονίδια που ρυθμίζονται από τα miRNAs. Ένα πλήθος γονιδίων με διαφορετική έκφραση σε καρκίνους ωοθηκών έχουν αναφερθεί. Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Targetscan και βρέθηκαν περίπου 200 miRNAs που αντι-συσχετίζονται με τα 186 κορυφαία διαφορεικά εκφραζόμενα γονίδια στον καρκίνο των ωοθηκών. Ανάμεσα σε αυτά τα 186 γονίδια, έχουν αναφερθεί δέκα σε δύο ανεξάρτητες μελέτες. Οι μεταβολές σε αυτά τα δέκα γονίδια θεωρούνται ότι σχετίζονται με καρκίνους των ωοθηκών μαζί με τα πιθανά ρυθμιστικά miRNAs τους. Τρία ζευγάρια miRNA/mRNA

δείχνουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον: 1) μείωση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου ID4 και αύξηση του miR-203 σε καρκίνους των ωοθηκών, 2) αύξηση του BCAT1 και μείωση των let7, miR-125b και miR-155 και 3) αύξηση του SERPINE1 και μείωση του miR-152. Το ID4 συμμετέχει σε ένα ρυθμιστικό κύκλωμα μαζί με έναν άλλο ογκοκαταστολέα, το BRCA1, που εξασφαλίζει έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης. Υπάρχει μια μέτρια συσχέτιση ανάμεσα στη μείωση του BRCA1 και του ID4. Η ρυθμιστική σχέση μεταξύ των BRCA1 και ID4 μπορεί να χάνεται σε πολλούς καρκίνους του μαστού και των ωοθηκών. Αύξηση του miR-203 μπορεί να ευθύνεται για αυτή την απορρύθμιση. Εφόσον η μείωση του ID4 έχει προταθεί σαν πιθανός βιοδείκτης επανεμφάνισης του καρκίνου του μαστού, τα ID4 και miR-203 μπορεί να χρησιμεύσουν σαν βιοδείκτες ασθένειας και στους καρκίνους των ωοθηκών.

Το BCAT1 είναι ένας απευθείας στόχος του c-myc που είναι σημαντικό για την ογκογένεση και έχει βρεθεί διπλασιασμένο σε πολλούς καρκίνους των ωοθηκών. Η οικογένεια let-7 επίσης ασκεί ογκοκατασταλτικό ρόλο σε πολλούς τύπους καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων και των ωοθηκών. Το miR-125b είναι ένας πιθανός ογκοκαταστολέας σε καρκίνους των ωοθηκών και μπορεί να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στοχεύοντας στο BCL3. Παρότι τα επίπεδα του miR-155 αυξάνονται σε λέμφωμα Β κυττάρων, το miR-155 έχει βρεθεί επανειλημμένα να μειώνεται σε καρκίνους των ωοθηκών με πιθανό ογκοκατασταλτικό ρόλο μέσω της στόχευσης του BCAT1. Η SERPINE1 (επίσης γνωστή και ως PIA-1) είναι ένας αναστολέας της ινωδόλυσης και εμπλέκεται στη διείσδυση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Το miR-152 μειώνεται σε ηπατοκυτταρικά και γαστρικά καρκινώματα και δρα σαν ογκοκαταστολέας στοχεύοντας την DNMT1. Σε καρκίνους ωοθηκών, το miR-152 μπορεί να χρησιμεύει σαν ογκοκαταστολέας στοχεύοντας την SERPINE1 με βάση τις προβλέψεις του αλγόριθμου Targetscan.

5. miRNAs & ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

5.1. Το προφίλ της έκφρασης των miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών

Το 2008 έγιναν μελέτες που χρησιμοποίησαν μικροσυστοιχίες miRs, Cdna και ιστών και έδειξαν μεγάλες γενωμικές μεταγραφικές μεταβολές στον καρκίνο των ωοθηκών (19). Ένας μεγάλος αριθμός miRs εμφανίζει ελαττωμένη έκφραση σε προχωρημένα στάδια του καρκίνου των ωοθηκών ή σε καρκίνο υψηλού βαθμού κακοήθειας, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα miRs συμμετέχουν στον κακοήγη μετασχηματισμό και στην εξέλιξη του όγκου. Τόσο η απώλεια αντιγράφων του γενωμικού υλικού (genomic copy number loss) όσο και οι επιγενετικές μεταβολές ευθύνονται γι' αυτή την απορρύθμιση, (μείωση της έκφρασης), συμμετέχοντας έτσι στην ευρύτερη γενωμική μεταγραφική απορρύθμιση. Οι συγγραφείς συνέκριναν το προφίλ έκφρασης των miRs από 18 κυτταρικές σειρές επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών (EOC) με 4 πρωταρχικές καλλιέργειες από αθάνατα επιθηλιακά κύτταρα (IOSE) και έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης 35 miRs διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές. Από αυτά, 31 miRs (88,6%, 31/35) παρουσίαζαν ελαττωμένη έκφραση στις κυτταρικές σειρές του EOC συγκριτικά με αυτές του IOSE, συμπεριλαμβανομένων και των ογκοκατασταλτικών miRs, let-7d και miR-127.

Οι Iorio και συν. ανέφεραν διαφορετικά προφίλ έκφρασης των miRs ανάμεσα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε φυσιολογικούς ιστούς. Από τα 29 miRs που μελετήθηκαν, έδειξαν ότι μόνο 4 υπερεκφράζονταν (miR-141, miR-200a, miR-200b, and miR-200c), ενώ τα υπόλοιπα 25, συμπεριλαμβανομένων των miR-199a, miR-140, miR-145 και miR-125b-1 υποεκφράζονταν στα καρκινικά δείγματα (21). Βρήκαν επίσης ότι τα αποτυπώματα των miRs ήταν διαφορετικά ανάμεσα στους διάφορους ιστολογικούς τύπους (ορώδη, διαυγοκυτταρικό, ενδομητριοειδή και βλεννώδη) του ωοθηκικού καρκινώματος. Άλλοι ερευνητές ανέλυσαν τα προφίλ των miRs που είναι χαρακτηριστικά για κάθε ισότυπο ΕΚΩ σταδίου I και βρήκαν πολύ ισχυρούς δείκτες για το διαυγοκυτταρικό και το βλεννώδη ισότυπο. Για την ακρίβεια ο διαυγοκυτταρικός ισότυπος χαρακτηρίζεται από υψηλότερη έκφραση των miR-30a-5p και miR-30a-3p, ενώ ο βλεννώδης παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των miR-192 και miR-194 (27).

Οι Nam και συν. παρουσίασαν τα προφίλ έκφρασης από 20 ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα, χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες miRNA και τα συνέκριναν με φυσιολογικά δείγματα (28). Βρήκαν λοιπόν ότι 11 miRs υπερεκφράζονταν (miR-16, miR-20a, miR-21, miR-23a, miR-23b, miR-27a, miR-93, miR-141, miR-200a, miR-200b και miR-200c), ενώ 12 miRs υποεκφράζονταν (miR-10b, miR-26a, miR-29a, miR-99a, miR-100, miR-125a, miR-125b, miR-143, miR-145, miR-199a, miR-214 και let-7b). Άλλοι ερευνητές ανέλυσαν τα προφίλ έκφρασης των miRs πρωτοπαθών ορώδων καρκίνων των ωοθηκών και των αντίστοιχων αυτών περιτοναϊκών μεταστάσεων, χρησιμοποιώντας miRNA QPCR μικροσυστοιχίες (29). Από τα miRs που μελετήθηκαν, 17 miRs είχαν διαφορετική έκφραση στις βλάβες από περιτοναϊκές εστίες συγκριτικά με αυτές του πρωτοπαθή όγκου.

Μεταξύ αυτών, τα miR-146a and miR-150 ήταν σημαντικά αυξημένα στα μεταστατικά δείγματα από το επίπλουν ρυθμίζοντας έτσι το σχηματισμό σφαιροειδούς σχηματισμού και την αντίσταση στη σισπλατίνη.

Ο άτλαντας του γενώματος του καρκίνου (The Cancer Genome Atlas project, TCGA) ανέλυσε την έκφραση των mRnas, την έκφραση των miRNAs, τη μεθυλίωση του υποκινητή και τον αριθμό των αντιγράφων του DNA σε ένα σύνολο 489 υψηλής κακοήθειας ορώδων καρκίνων των ωοθηκών (30). Σύμφωνα με τον TCGA ο ΕΚΩ χαρακτηρίζονταν από μεταλλάξεις στο TP53 σε ποσοστό 96 τις εκατό του συνόλου του. Ταυτόχρονα υπήρχε μια χαμηλή, αλλά στατιστικά σημαντική συχνότητα επαναλαμβανόμενων σωματικών μεταλλάξεων σε άλλα 8 γονίδια συμπεριλαμβανόμενων των NF1, BRCA1, BRCA2, RB1 και CDK12. Επίσης σύμφωνα με αυτή την ανάλυση οι καρκίνοι των ωοθηκών μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικούς υπότυπους: 4 μεταγραφικούς υπότυπους, 3 υπότυπους miR και 4 υπότυπους με βάση τη μεθυλίωση του υποκινητή. Η ενσωματωμένη γενωμική ανάλυση αποκάλυψε ένα ρυθμιστικό δίκτυο miRNAs, το οποίο προσδιόρισε έναν ισχυρό μεσεγχυματικό υπότυπο που συνδέεται με χαμηλό ποσοστό επιβίωσης σε 459 περιπτώσεις με ΕΚΩ, με βάση τις αναλύσεις του TCGA (31). 8 miRs κλειδιά ανιχνεύτηκαν (miR-25, miR-29c, miR-101, miR-128, miR-141, miR-182, miR-200a και miR-506) και θεωρήθηκε ότι ρυθμίζουν το 89% των στόχων σε αυτό το δίκτυο.

5.2. miRNAs ως ρυθμιστές της μετάστασης

5.2.1. miRNAs και καρκινικά βλαστικά κύτταρα

Ένας υποπληθυσμός από βλαστικά κύτταρα έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε διάφορες κακοήθειες. Αυτά τα βλαστικού τύπου κύτταρα ονομάζονται καρκινικά βλαστικά κύτταρα και χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να ανανεώνονται διαρκώς και να διαφοροποιούνται σε διάφορους τύπους κυττάρων, συντελώντας έτσι στη μεγάλη ετερογένεια των καρκινικών κυττάρων (16). Από τότε που πρώτοι οι Baraτ και συν. ανέφεραν τη συμμετοχή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στη γένεση του καρκίνου των ωοθηκών (32), τα CSCs (cancer stem cells, καρκινικά βλαστικά κύτταρα) μελετήθηκαν εκτενώς σε κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών, σε καρκινικούς ιστούς και στον ορό των ασθενών (51,52,56,57,123,124). Χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι δείκτες για το χαρακτηρισμό των ωοθηκικών CSCs, όπως οι CD-44, 117, 133, 24 και αλδεϋδική αφυδρογονάση-1 A1 (ALDH1) και στην πορεία έγιναν αρκετές έρευνες που έδειξαν ότι ο κεντρικός ρυθμιστικός ρόλος των miRs στην ωοθηκική καρκινογένεση πηγάζει από την συμμετοχή τους στη γενετική τροποποίηση των CSCs, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τη λειτουργικότητά τους. Μία από αυτές μελέτησε το ρόλο των miR-214 στο σχηματισμό του ωοθηκικού, βλαστικού τύπου κυττάρων (CSC) φαινοτύπου και βρήκε ότι η ενισχυμένη έκφραση του miR-214 στοχευμένου P53/Nanog axis συνεισέφερε στην ικανότητα πολλαπλασιασμού των ωοθηκικών καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSC confluence) και στην ικανότητα της αυτοανανέωσης τους (36).

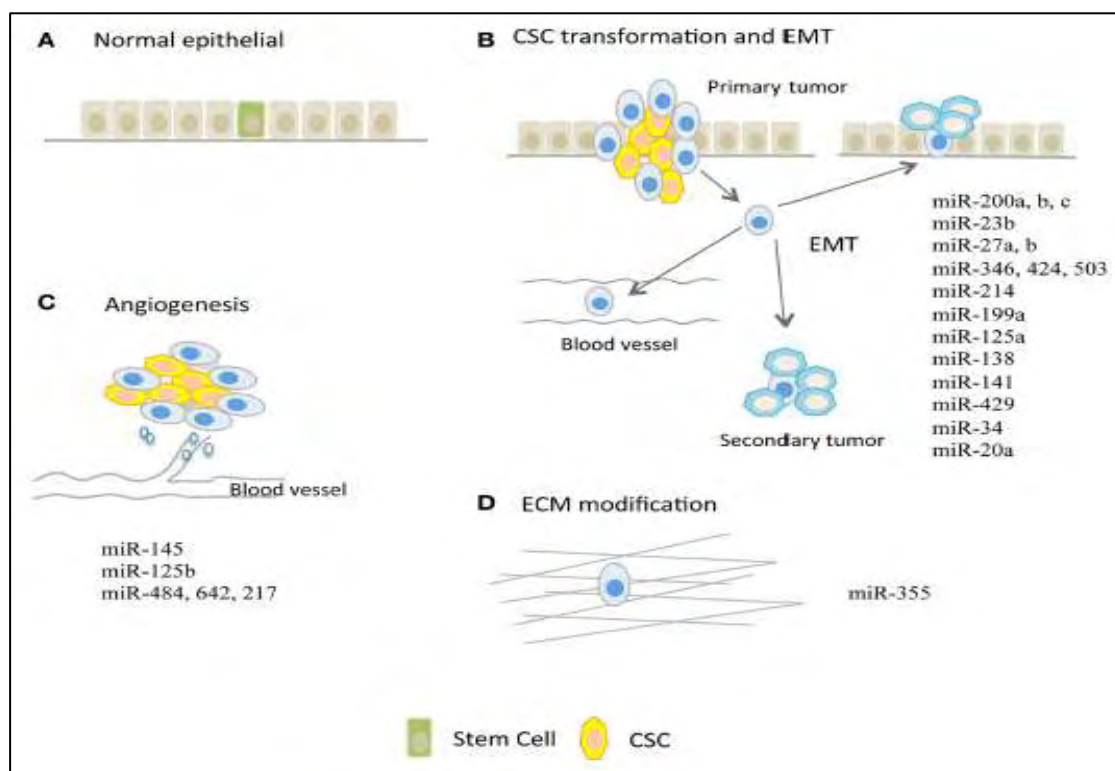
Τα microRNAs, θα μπορούσαν επίσης να υπογραμμίσουν το μηχανισμό της επαγόμενης χημειοαντοχής από τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Ερευνητές έδειξαν ότι σε ALDH1+ και χημειοανθεκτικά κύτταρα υπερεκφράζονται τα miR-23b, miR-27a, miR-27b, miR-346, miR-424 και miR-503 και μεταξύ αυτών, τα επίπεδα έκφρασης του miR-27, σχετίζονταν και με την έκταση της μετάστασης του καρκίνου των ωοθηκών (35).

Αναφορικά με τη χημειοαντοχή, μια ακόμη μελέτη συσχέτισε τα CD44+CD117+ καρκινικά βλαστικά κύτταρα, με το miR-199a. Βρέθηκε λοιπόν ότι σε ανθρώπινα ωοθηκικά καρκινικά κύτταρα το miR-199a κατέστειλε την έκφραση του CD44 και εμπόδισε τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διείσδυση των CD44+CD117+ ωοθηκικών καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Η καταστολή του CD44

από το miR-199a μείωσε την έκφραση του πολυανθεκτικού γονιδίου ABCG2, αυξάνοντας έτσι τη χημειοευαισθησία των ωοθηκικών CSCs (37). Επιπρόσθετα, το miR-199a βρέθηκε ότι έχει τη δυνατότητα να αντιστρέψει την αντίσταση στη σισπλατίνη, στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών, μέσω της αναστολής της κινάσης mTOR (mammalian target of rapamycin) (38) (Πίνακας 3).

5.2.2. miRNAs και επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMM)

Ο καρκίνος είναι μια πολυδύναμη και πολύπλοκη διαδικασία κατά τη διάρκεια της οποίας τα επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν χαρακτηριστικά μεσεγχυματικών κυττάρων, τα μεσεγχυματικά να αποκτήσουν χαρακτηριστικά επιθηλιακών, καθώς επίσης και τα μεσεγχυματικά να γίνουν ενδοθηλιακά κύτταρα. Η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMM) είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την πολικότητα και την προσκολλητικότητα τους και αποκτούν έτσι αυξημένη κινητικότητα και διεισδυτικότητα. Είναι ένας μηχανισμός που επιτρέπει στα κύτταρα του όγκου να διαφύγουν από τον πρωτοπαθή όγκο, να διεισδύσουν στο γειτονικό φυσιολογικό παρέγχυμα, να εισέλθουν στη λεμφική κυκλοφορία και στην κυκλοφορία του αίματος και να ξεκινήσει η λεμφο-αιματογενής μετάσταση (125-127) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Τα miRNAs ρυθμίζουν τη μετάσταση των όγκων στον καρκίνο των ωοθηκών. (Α) Φυσιολογικό επιθήλιο και πιθανά περιθάλποντα βλαστοκύτταρα. (Β) miRs τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του μετασχηματισμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSC) και στη διαδικασία της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης. (C) miRs τα οποία εμπλέκονται στην αγγειογένεση του όγκου, η οποία είναι απαραίτητη για την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου, ενώ έχει αποδειχθεί χρήσιμη διαδικασία και στη μετάσταση του όγκου. (D) Το miR-355, το οποίο αυξάνει την αλληλεπίδραση του κυττάρου με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM).

Η έναρξη της EMM, δηλαδή η αποδιαφοροποίηση των πολωμένων, ακίνητων επιθηλιακών κυττάρων σε κινητά μεσεγχυματικά κύτταρα συμβαίνει όταν μειώνονται τα επίπεδα της E-cadherin, μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης τύπου 1 που είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της ταυτότητας των καρκινικών κυττάρων (42).

Η οικογένεια των miR-200 παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη μετάβαση, ρυθμίζοντας τους μεταγραφικούς καταστολείς των γονιδίων της E-cadherin, ZEB-1 και ZEB-2. Οι ZEB-1 και ZEB-2 συνδέονται με τις E-boxes περιοχές του υποκινητή της E-cadherin και προκαλούν μεταγραφική καταστολή της έκφρασης της E-cadherin (43-46).

Συνεπώς, η υπερέκφραση των miR-200a/b/c και/ή του miR-141 μειώνει τα επίπεδα των ZEB1/2, οδηγώντας σε υψηλότερα επίπεδα E-cadherin και σε επιθηλιακό φαινότυπο.

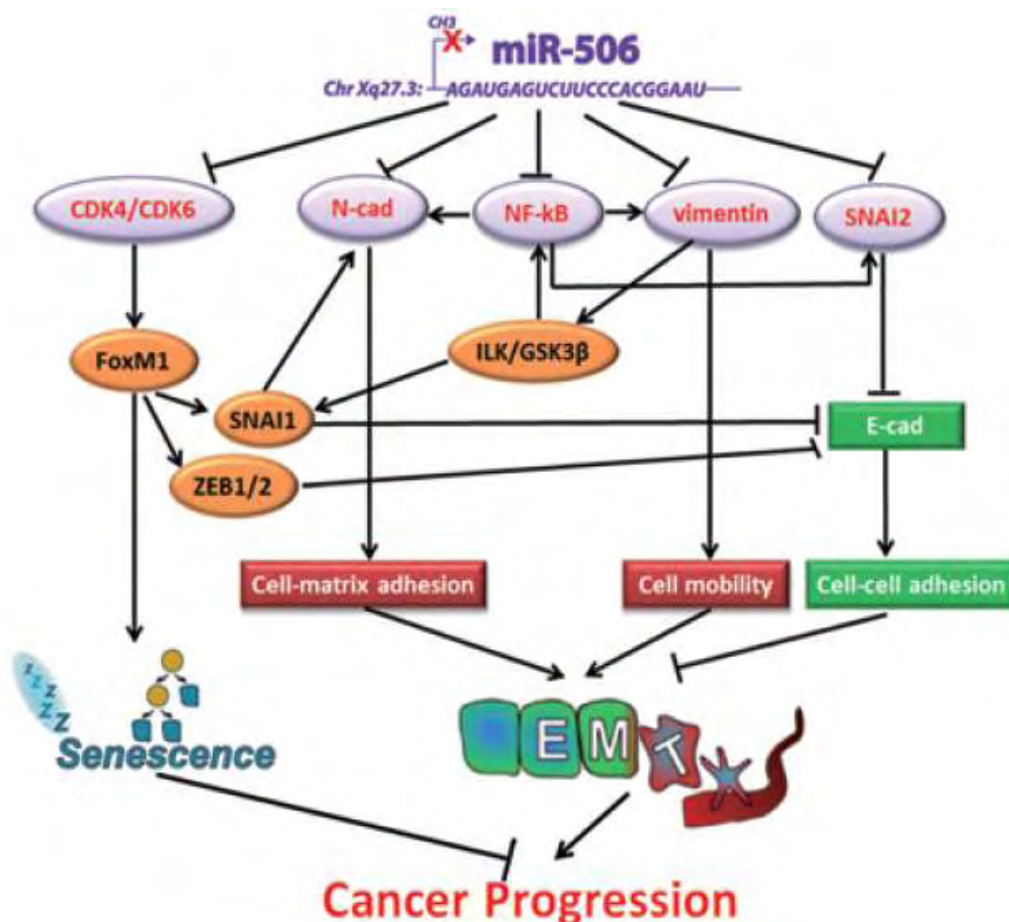
Στη διαδικασία της EMM περιλαμβάνονται διάφοροι ρυθμιστές όπως οι αυξητικοί παράγοντες, οι παράγοντες μεταγραφής και τα μόρια προσκόλλησης. Η υπερέκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) στον καρκίνο των ωοθηκών σχετίζεται με κακή έκβαση της νόσου και επάγει την EMM σε καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών. Το EGFR μονοπάτι οδηγεί σε μεταγραφική καταστολή του miR-125a, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα PEA, της οικογένειας ETS. Η υπερέκφραση του miR-125a επάγει τη μετατροπή των κυττάρων των ωοθηκών άκρως διηθητικού καρκίνου από μεσεγχυματικά σε επιθηλιακά, υποδηλώνοντας πως το miR-125a είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της EMM (39).

Το miR-138 βρέθηκε υποεκφρασμένο σε υψηλά διεισδυτικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών, ενώ βρέθηκε να υπερεκφράζεται in vivo εμποδίζοντας τη μετάσταση του καρκίνου των ωοθηκών (47). Ταυτόχρονα, το miR-138 φαίνεται να καταστέλλει

άμεσα και την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον EMM φαινότυπο, όπως τα SOX4 (SRY-related HMG-box) και HIF-1α (hypoxia inducible factor 1α), ενώ η υπερέκφραση των SOX4 και HIF-1α, αντιστρέφει την δράση του miR-138, με συνέπεια την προώθηση της καρκινικής διεύθυνσης (39).

Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης των miR-141 και miR-429 ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε μεσεγχυματικού-τύπου και πιο μεταστατικά κύτταρα από κυτταρική σειρά HEY, συγκριτικά με επιθηλιακού-τύπου και λιγότερο διευσδυτικά κύτταρα κυτταρικής σειράς OVCAR3. Η εξαναγκασμένη υπερέκφραση των miR-429 και miR-141 στα HEY κύτταρα ήταν σε θέση να καταστείλει τα βασικά χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικού-τύπου κυττάρων, αλλά να ενεργοποιήσει αυτά των επιθηλιακού-τύπου κυττάρων (48). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η οικογένεια miR-200 όχι μόνο αναστέλλει τον φαινοτυπικό σχηματισμό CSC, αλλά εμποδίζει εξίσου τα καρκινικά κύτταρα από την αποκόλληση και την ενδαγγείωση. Είναι γνωστό ότι τα σχετιζόμενα με καρκίνο miRs ρυθμίζουν και ρυθμίζονται από ογκογονίδια και από ογκοκατασταλτικά γονίδια. Για παράδειγμα, το miR-34, που έχει ογκοκατασταλτική δράση, μεταγράφεται από το p53. Το miR-34a/b/c που επάγεται από το p53 υποεκφράζεται στον καρκίνο των ωοθηκών. Η μετάλλαξη του p53 προωθεί την EMM των καρκινικών κυττάρων, αυξάνοντας την έκφραση της πρωτεΐνης Snail1. Η οικογένεια miR-34 των miRNAs καταστέλλει τη λειτουργία της Snail1 όταν συνδεθεί με την υψηλά διατηρημένη 3'-UTR περιοχή στη Snail1 και στα ρυθμιστικά της μόρια, όπως είναι οι β-catenin, LEF1 και Axin2. Κατά συνέπεια, η μεταλλαγμένη p53 μειώνει τα επίπεδα του miR-34a/b/c, ώστε να διατηρήσει το επίπεδο της πρωτεΐνης Snail1 που είναι ένας zinc-finger μεταγραφικός καταστολέας, ο οποίος ρυθμίζει τον προγραμματισμό της EMM από τα καρκινικά κύτταρα (49,50). Οι πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται γι' αυτή τη μείωση είναι η μη φυσιολογική μεθυλίωση του υποκινητή των γονιδίων των miRNAs ή οι μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων τους (49).

Παρότι τα περισσότερα miRs που έχουν μελετηθεί έχουν κατασταλτική δράση επάνω στην EMM, το miR-20a φαίνεται ότι συμμετέχει στην προς τα κάτω ρύθμιση του PTEN (ογκοκατασταλτικό γονίδιο) και επομένως οδηγεί σε επιθηλιο-μεσεγχυματική φαινοτυπική μετάβαση (40).



Εικόνα 6. Το *miR-506* ως ρυθμιστής της EMT. Στόχοι του *miR-506*, μέσω των οποίων εμποδίζεται η εξέλιξη του καρκίνου και καταστέλλεται η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT).

5.2.3. microRNAs και εξωκυττάρια τροποποίηση της θεμέλιας ουσίας (ECM)

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (extracellular matrix) αποτελείται από πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού και γλυκοζαμινογλυκάνες που προσφέρουν δομική και βιοχημική υποστήριξη στα κύτταρα τα οποία περιβάλλουν. Η διείσδυση και η μετάσταση των όγκων επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης του μικροπεριβάλλοντός τους και συγκεκριμένα της εξωκυττάριας ουσίας που τους περιβάλλει (31–33). Η ανώμαλη έκφραση των miRs θα μπορούσε να διευκολύνει τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, μέσω της καταστροφής της εξωκυττάριας ουσίας (**Πίνακας 3**). Για παράδειγμα, στο γλοίωμα, το miR-21 προτάθηκε ως ογκο-miR (oncomiR), εξαιτίας της ικανότητάς του να καταστέλλει την έκφραση των PRECK και TIMP2, που δρουν ως αναστολείς μεταλλοπρωτεασών (MMPs), προσδίδοντας έτσι μεταστατική ικανότητα (51). Σε ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνο, το miR-21 βρέθηκε να καταστέλλει την έκφραση του PTEN και κατά συνέπεια να αυξάνει τη

φωσφορυλίωση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης και την έκφραση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και 9 (52). Εκτός από τη ρύθμιση των κανονικών MMPs μερικά miRs εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου και εξωκυττάριας ουσίας καθώς και στη ρύθμιση συστατικών της τελευταίας. Η γλυκοπρωτεΐνη tenascin C, μια πρωτεΐνη που αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρου και εξωκυττάριας ουσίας, δείχθηκε ότι είναι στόχος του miR-355 και ότι απώλεια του miR-355 ενίσχυσε τις μεταστατικές ικανότητες των κυττάρων του όγκου (53). Το miR-29c καταστέλλει απευθείας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την εξωκυττάρια ουσία, όπως για παράδειγμα της laminin gamma 1 και πολλών κολλαγόνων σε ρινοφαρυγγικά καρκινώματα (54).

Παρά το ότι έχουν γίνει μεγάλες αναφορές σε σχέση με τη συμμετοχή των miRs στη διαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στον καρκίνο του μαστού, στο γλοίωμα και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, μελέτες που αφορούν τον καρκίνο των ωοθηκών βρίσκονται σε εξέλιξη. Μια από αυτές έδειξε ότι το miR-355, που φαίνεται να εμποδίζει τη μετάσταση του όγκου, στοχεύοντας στο TNC (γονίδιο που κωδικοποιεί την matrix πρωτεΐνη), ήταν υποεκφρασμένο στις τρεις καρκινικές σειρές, ανθεκτικές στην πακλιταξέλη και στη μια κυτταρική σειρά, ανθεκτική στη σισπλατίνη. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στις μεταβολές της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση που θα μπορούσε να οδηγήσει σε χημειοαντοχή στον καρκίνο των ωοθηκών (53,55,56,57).

5.2.4. miRNAs και αγγειογένεση

Η αγγειογένεση του όγκου είναι μια ζωτική διαδικασία, κατά την οποία οι όγκοι εξελίσσονται και μετατρέπονται από καλοήθεις σε κακοήθεις. Από τη μία είναι υπό συζήτηση κατά πόσο η αγγειογένεση είναι απαραίτητη για τη μετάσταση του όγκου από την άλλη είναι βέβαιο ότι αυτή η διαδικασία διευκολύνει τα κύτταρα να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και να επεκταθούν σε άλλες περιοχές (58-60). Τα καρκινικά κύτταρα, υπό την επίδραση της υποξίας, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τους αυξάνουν την έκφραση των miRs που διατηρούν την ανάπτυξη του όγκου και την αγγειογένεση ή μειώνουν την έκφραση των miRs που καταστέλλουν την νεοαγγειογένεση. Για παράδειγμα, το υπερεκφραζόμενο miR-27a εμποδίζει την έκφραση του ZBTB10, ρυθμίζοντας έμμεσα τα επίπεδα του

αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και του υποδοχέα του (VEGFR). Αντίθετα, τα miR-16, miR-15b, miR-20a και miR-20b που καταστέλλουν την αγγειογένεση, μέσω της ρύθμισης των επιπέδων των VEGF και VEGFR είναι σταθερά υποεκφρασμένα στα καρκινικά κύτταρα.

miRNA	Targets	Effects on tumor metastasis	Reference
CSC-RELATED miRs			
miR-23b	N/I	Enhances CSC transformation	(9)
miR-27a, b	VEGF, Cox2, and Sp1	Enhance CSC transformation and angiogenesis	(9, 19)
miR-214	P53/Nanog	Enhances CSC transformation	(10)
miR-346	N/I	Enhances CSC transformation	(9)
miR-424	N/I	Enhances CSC transformation	(9)
miR-503	N/I	Enhances CSC transformation	(9)
miR-199a	CD44, mTOR, HIF-1 α , VEGF, HER2, and HER3	Inhibits CSC transformation and angiogenesis	(11, 12, 20)
miR-200a	ZEB-2	Inhibits CSC transformation and EMT process	(8, 15)
miR-200c	ZEB-1 and vimentin	Inhibits CSC transformation and EMT process	(7, 15)
EMT-RELATED miRs			
miR-20a	PTEN	Enhances EMT process	(21)
miR-34	N/I	Inhibits EMT process	(22, 23)
miR-125a	AT-rich interactive domain 3B (ARID3B)	Inhibits EMT process	(13)
miR-138	SRY-related high-mobility group box (SOX4) and HIF-1 α	Inhibits EMT process	(14)
miR-141	N/I	Inhibits EMT process	(15)
miR-200b	N/I	Inhibits EMT process	(15)
miR-429	N/I	Inhibits EMT process	(15)
ECM-RELATED miR			
miR-355	Tenascin C (TNC)	Increases cell-ECM interaction	(24)
ANGIOGENESIS-RELATED miRs			
miR-22	N/I	Increases angiogenesis	(25)
miR-150, 146a	N/I	Increase angiogenesis	(26)
miR-182	BRCA1	Increases angiogenesis	(27)
miR-124	N/I	Decreases angiogenesis	(28)
miR-125b	HIF-1 α , VEGF, HER2, and HER3	Decreases angiogenesis	(20)
miR-145	p70S6K1, HIF-1 α , and VEGF	Decreases angiogenesis	(29)
miR-484, 642, 217	VEGFB and VEGFR2	N/I	(30)

N/I, not identified.

Πίνακας 3. Απορρύθμιση της έκφρασης των *miRNAs* στον καρκίνο των ωοθηκών και τα γονίδια στόχοι τους. **CSC:** Cancer Stem Cells, **EMT:** Epithelial-Mesenchymal Transition, **ECM:** Extracellular Matrix.

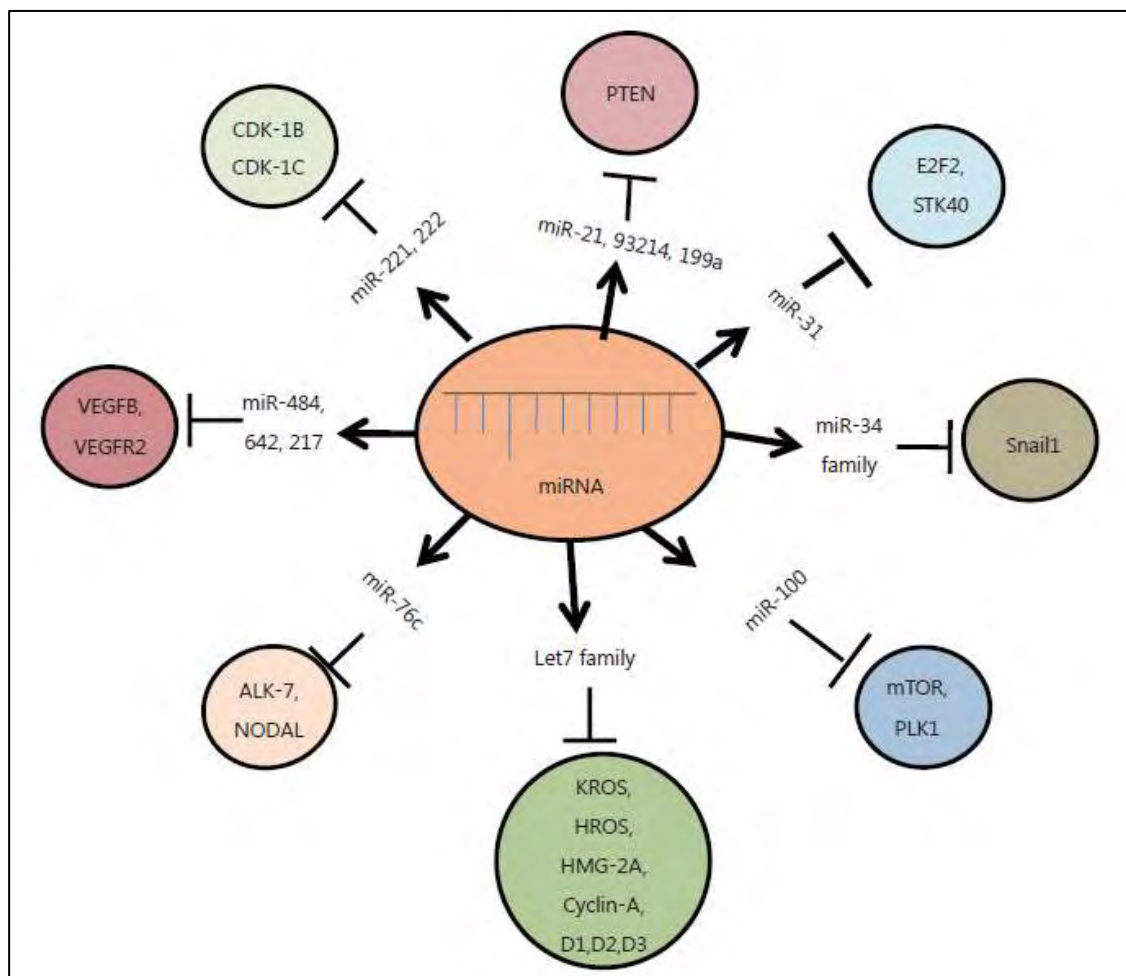
Έγιναν και άλλες μελέτες, που έδειξαν ότι το miR-145 υποεκφράζονταν σε καρκινικούς κυτταρικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές, εξαιτίας της ανασταλτικής του δράσης επάνω στην νεοαγγειογένεση (60). Μια μηχανιστική μελέτη απέδειξε ότι το miR-145 μπορούσε να περιορίζει την έκφραση του p70S6K1, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την έκφραση τόσο του HIF-1 α , όσο και του VEGF. Βρέθηκαν επίσης και άλλα miRs, όπως τα miR-125b και miR-199a, που είχαν ογκοκατασταλτική δράση, στοχεύοντας στους HIF-1 α και VEGF και περιορίζοντας την αγγειογένεση (59). Επιπλέον, τα HER2 και HER3 (human epidermal growth factor receptors 2 & 3) προτάθηκαν ως άμεσοι στόχοι των miR-125b και miR-199a, καθώς η υπερέκφραση των miR-125b και miR-199a σε μοντέλα ξеноμοσχεύματος του καρκίνου των ωοθηκών, οδήγησε στην αποτυχία της αγγειογένεσης που

προάγεται από τα δύο αυτά γονίδια. Κάποια miRs, όπως τα miR-217, miR-484 και miR-642 ρυθμίζουν άμεσα τα VEGFB και VEGFR2 ρυθμιστικά μονοπάτια και προβλέπουν την χημειοαντοχή (61) (Πίνακας 3).

5.3. Μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια και ΕΚΩ

Τα miRNAs ρυθμίζουν διάφορα μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στην παθογένεση του καρκίνου των ωοθηκών και αλληλεπιδρώντας με διάφορα γονίδια στόχους ρυθμίζουν τις λειτουργίες αυτών των γονιδίων στους διάφορους τύπους καρκίνου. Ένα από τα πιο σημαντικά μονοπάτια που παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου των ωοθηκών και ειδικότερα στην επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) είναι το μονοπάτι του μετατροπέα του αυξητικού παράγοντα β (TGF-β), μέσω του miR-181a. Τα γονίδια στόχοι του μονοπατιού TGF-β είναι τα SMADs (Smad2 και Smad3, συμπεριλαμβανόμενου και του Smad7). Άλλα σημαντικά μονοπάτια είναι τα PI3K/AKT, G-PCR, Wnt/β-catenin και ERK5 (62). Ο let-7 στοχεύει διάφορα ογκογονίδια, όπως τα c-Myc, ras, HMGA (high-mobility group A), JAK (Janus protein tyrosine kinase), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) και NIFK. Μια άλλη μελέτη υποστηρίζει ότι το let-7a συμμετέχει στην καρκινογένεση, στον πολλαπλασιασμό και τη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων ρυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο μέσω του μονοπατιού NIFK/p53/p21/CDK (63).

Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών χαρακτηρίζεται ακόμα από μεταβολές στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), στο μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR και μεταλλάξεις ή επιγενετικές απώλειες των BRCA1/2, PTEN και TP53 (64). Εκτός από τα μονοπάτια της IL-6R-JAK-STAT3, του πυρηνικού παράγοντα κάππα-B και του VEGF έχουν αναφερθεί και άλλα μονοπάτια που ρυθμίζουν διάφορες πτυχές του καρκίνου των ωοθηκών (65) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Διαγραμματική απεικόνιση διάφορων miRNAs και των γονιδίων στόχων τους . Αυτά τα miRNAs ρυθμίζουν διάφορα κυτταρικά μονοπάτια είτε με αύξηση της ρύθμισης είτε με μείωση της ρύθμισης των γονιδίων στόχων τους , προκαλώντας τελικά καρκίνο.

5.4. miRNAs ως ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου

Τα miRNAs στοχεύουν γονίδια του κυτταρικού κύκλου, μεταβάλλοντας την έκφραση τους, γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η οικογένεια let-7 των miRNAs ρυθμίζει διάφορα γονίδια του κυτταρικού κύκλου, όπως τα Cyclin-A, D1, D2, D3 και HMG-2A (66). Το miRNA-31 που παρατηρείται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε ιστούς ορωδών καρκίνων των ωοθηκών αναστέλλει την έκφραση διαφόρων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F2 και STK40. Τα miR-221 και miR-222 που παρουσιάζουν αύξηση της έκφρασης τους, έχουν αντιαποπτωτική δράση ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων του κυτταρικού κύκλου, όπως τα CDK1B (p27) και CDK1C (p57) (67). Το miR-210, μέσω του HIF (Hypoxia Inducible Factor) μονοπατιού ρυθμίζει την

έκφραση του e2f3 μεταγραφικού παράγοντα του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, το miR-210 μειώνει την έκφραση του E2F μεταγραφικού παράγοντα στους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, υποδηλώνοντας ότι παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην έναρξη του όγκου μέσω της ρύθμισης της υποξικής απάντησης των καρκινικών κυττάρων. Τελευταία ταυτοποιήθηκαν και άλλα miRNAs που φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο, μέσω του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού.

6. miRNAs & ΔΙΑΓΝΩΣΗ

6.1. Διαγνωστικοί βιοδείκτες

Η καθυστερημένη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών οφείλεται κυρίως στην έλλειψη συμπτωματολογίας στα αρχικά στάδια της νόσου, γεγονός που οδηγεί στη μετάσταση.

6.1.1. Σύγχρονοι βιοδείκτες

Οι διαρκείς τεχνολογικές εξελίξεις της πρωτεομικής και της γενωμικής έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση διαφόρων μοριακών δεικτών για τη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών. Αυτοί οι βιοδείκτες θα μπορούσαν ευρύτερα να κατηγοριοποιηθούν στους μοριακούς και γονιδιακούς βιοδείκτες. Οι γονιδιακοί βιοδείκτες μετρούν μεταλλάξεις, επιγενετικές αλλαγές (μεθυλίωση του DNA και μετατροπές ιστονών) και επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων που συμμετέχουν στη γονιδιακή ρύθμιση. Κληρονομικές μεταλλάξεις γονιδίων της γεννητικής σειράς, όπως είναι τα γονίδια του καρκίνου του μαστού BRCA1 και BRCA2 και επιδιορθωτικών γονιδίων του DNA όπως είναι τα hMLH1 και hMLH2 έχουν ανιχνευτεί σε ποσοστό τουλάχιστον 10% όλων των ΕΚΩ.

Το υδατανθρακικό αντιγόνο 125 (CA-125) είναι ο πιο ευρέως διαδεδομένος βιοδείκτης για τη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών. Το CA-125 είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το MUC16 γονίδιο. Αυξημένα επίπεδα CA-125 στον ορό ανιχνεύονται σε περίπου 80-85% των γυναικών σε προχωρημένο στάδιο του καρκίνου των ωοθηκών και μόνο στο 50% των ασθενών στο στάδιο I του καρκίνου των ωοθηκών. Κατά συνέπεια, ο CA-125 δεν είναι αρκετά ευαίσθητος ή ειδικός για την πρόωρη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών και χρησιμοποιείται κυρίως για την παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου σε ασθενείς με εγκατεστημένο καρκίνο των ωοθηκών. Άλλοι βιοδείκτες περιλαμβάνουν τη λεπτίνη, την προλακτίνη, την οστεοποντίνη και τον αυξητικό παράγοντα ινσουλίνης (IGF-II) (68).

Άλλος ένας σημαντικός βιοδείκτης για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών είναι η ανθρώπινη επιδιδυμική πρωτεΐνη 4 (HE4), μια γλυκοπρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το WFDC2 γονίδιο. Αυξημένα επίπεδα HE4 έχουν αναφερθεί σε πάνω από 50% ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, των οποίων οι όγκοι

δεν εκφράζουν τον CA-125, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο HE4 υπερτερεί του CA-125 σε ότι αφορά την παρακολούθηση του καρκίνου των ωοθηκών. Επίσης, ο HE4 μπορεί να διακρίνει καλοήθεις από κακοήθεις όγκους, οπότε πλεονεκτεί σε σχέση με τον CA-125 όσον αφορά την ανίχνευση καρκίνου σε αρχικά στάδια. Αντίθετα ο CA-125 δεν είναι καρκινο-ειδικός και μπορεί να αυξηθεί σε πολλές καλοήθεις καταστάσεις. Πολλές μελέτες σχετικά με τον προληπτικό έλεγχο (screening) του καρκίνου των ωοθηκών θεωρούν ότι η συνδυαστική χρήση βιοδεικτών είναι πιο αξιόπιστη, ειδική και ευαίσθητη από τη χρήση ενός μόνο βιοδείκτη. Παρόλα αυτά, το βασικό μειονέκτημα των βιοδεικτών παραμένει η περιορισμένη διαγνωστική τους αξία, εξαιτίας της χαμηλής ειδικότητας και ευαισθησίας αλλά και του υψηλού κόστους.

6.1.2. miRNAs ως διαγνωστικοί βιοδείκτες

Η εύρεση ενός εναλλακτικού βιοδείκτη, μη επεμβατικού, ευαίσθητου και πιο ειδικού για την ανίχνευση του καρκίνου των ωοθηκών στα αρχικά στάδια είναι απαραίτητη για την καλύτερη διαχείριση των ασθενών.

Η ανίχνευση των τροποποιημένων επιπέδων των miRNAs, ως αποτέλεσμα της απορρύθμισής τους στο αίμα, στον ορό και στα εξωσώματα που προκύπτουν από τον όγκο έχει την προοπτική να χρησιμεύσει ως διαγνωστικός βιοδείκτης για την ανίχνευση του καρκίνου των ωοθηκών (Πίνακας 4).

Tissue type	Upregulation			Downregulation		
Serous adenocarcinoma	miR-7	miR-200a/c		miR-148b		
	miR-22	miR-302b		miR-211		
	miR-373	miR-34c-5p		miR-31		
	miR-449a	miR-146b-5p				
Endometrioid adenocarcinoma	miR-9	miR-183	miR-205	miR-22	miR-222	miR-324-3p
	miR-96	miR-196a	miR-212	miR-101	miR-299-5p	miR-325
	miR-182	miR-196b	miR-375	miR-194	miR-302b	miR-373
	miR-141	miR-200a/b/c				
Clear cell adenocarcinoma	miR-29b	miR-200a/c		miR-20a		
	miR-30a	miR-486-5p				
	miR-30e					
Mucinous adenocarcinoma	miR-141	miR-200b				
Undifferentiated carcinoma				miR-9		
				miR-18		

Πίνακας 4. Ιστολογικοί τύποι και έκφραση των miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών.

Περίπου 20 μελέτες έχουν δημοσιευθεί μέχρι τώρα σχετικά με το διαγνωστικό δυναμικό των κυκλοφορούντων miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών. Από τους Taylor και συν. αναφέρθηκε για πρώτη φορά ότι οκτώ miRNAs εξωσωμικής

προέλευσης (miR-21, miR-141, miR-200A, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205 και miR-214) βρέθηκαν να είναι αυξημένα στον ορό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών σε σύγκριση με καλοήγη δείγματα. Το προφίλ των οκτώ αυτών miRNAs, έχει αναφερθεί να υπερεκφράζεται σε ιστούς καρκίνου των ωοθηκών.

Επίσης αυτά τα miRNAs υπερεκφράζονται ακόμη και σε ασθενείς σε πρώιμα στάδια του καρκίνου των ωοθηκών. Τα αποτυπώματα των miRNAs από τα εξωσώματα ήταν παράλληλα με εκείνα από τα καταγόμενα καρκινικά κύτταρα, πράγμα που υποδηλώνει ότι το προφίλ των κυκλοφορούντων miRNAs στον ορό αντικατοπτρίζει με ακρίβεια τα προφίλ miRNA των όγκων (69). Ακολούθησαν και άλλες έρευνες που έδειξαν τη διαγνωστική δυνατότητα των κυκλοφορούντων miRNAs στα βιολογικά υγρά, όπως στον ορό, στο πλάσμα, στο αίμα και στα ούρα (70) (Πίνακας 5).

Table 1 Circulating miRNAs as potential diagnostic biomarkers of ovarian cancer

Reference	Elevated miRNA	Decreased miRNA	Source	Tumor histology (n)		FIGO stage (n)		Control (n)		
				Serous	Others	I-II	III-IV	HC	Ben	Bor
[50], 2008	miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205, miR-214		Serum (exosome)	50		20	30	10	10	
[65], 2009	miR-21, miR-92, miR-93, miR-126, miR-29a	miR-155, miR-127, miR-99b	Serum	17	11	10	18	15		
[66], 2010	miR-30c-1	miR-342-3p, miR-181a, miR-450-5p	Whole blood	21	3	Relapsed		15		
[67], 2012	miR-182, miR-200a, miR-200b, miR-200c		Serum	28		1	27	28		
[68], 2013		miR-132, miR-26a, let-7-b, miR-145	Serum	18		3	14	12		
[69], 2013	miR-205	let-7f	Plasma	179	181	133	227	200		
[70], 2013	miR-16, miR-21, miR-191 (EAO), miR-16, miR-191, miR-4284 (SOC)		Plasma	21	14	12	23	20	33	
[71], 2013	miR-21		Serum	68	26	32	62	40		
[72], 2013	miR-221		Serum	70	26	32	64	35		
[73], 2014	miR-191-5p, miR-206, miR-548a-3p, miR-320a, miR-574-3p, miR-590-5p, miR-34c-5p, miR-106b-5p	miR-19a-3p, miR-30a-5p, miR-645, miR-150-5p	Plasma	18	0	6	12	24		
[74], 2014	miR-1274a, miR-625-3p, miR-720	miR-106b, miR-126, miR-150, miR-17, miR-20a, miR-92a	Plasma	42		6	36	23	36	
[75], 2015	miR-7, miR-429	miR-25, miR-93	Serum	120	60	32	147	66		
[41], 2015	miR-30-5p		Urine	39		16	18	30	26	
[76], 2015	miR-141, miR-200c		Serum	16	58	54	20	50		19
[77], 2015		miR-145	Serum	18	64	31	63	135		
[78], 2015		let-7f-5p, miR-122, miR-152, miR-25-3p	Serum/plasma	20		6	19		25	
[79], 2015	miR-200a, miR-200b, miR-200c		Serum	70		33	37	70		
[78], 2015	miR-200b		Plasma	51		6	45	25	25	

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics, EAO: endometriosis associated ovarian carcinoma, SOC: serous ovarian carcinoma, HC: healthy control, Ben: Benign control, Bor: borderline tumor

Πίνακας 5. Κυκλοφορούντα miRNAs ως πιθανοί διαγνωστικοί βιοδείκτες του καρκίνου των ωοθηκών.

Οι Hauser και συν. διερεύνησαν το πρότυπο έκφρασης miRNA σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών σε δείγματα ολικού αίματος (που περιέχουν δηλαδή και κυτταρικό κλάσμα) με συστοιχίες miRNAs. Ανέφεραν ότι το

miR-30c-1-3p υπόκειται σε υπερέκφραση (upregulation) ενώ τα miR-342-3p, miR-181-3p, και miR-450b-5P σε υποέκφραση (downregulation) σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (71).

Οι Kan και συν. ανέφεραν ότι τα επίπεδα έκφρασης στον ορό τεσσάρων miRNAs συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας miR-200 (miR-182, miR-200a/b/c) ήταν σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές. Ταυτοποίησαν ένα πολυπαραγοντικό μοντέλο από τον συνδυασμό των miR-200b και miR-200c που έχει καλή προγνωστική ικανότητα στη διάκριση των ασθενών με ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών από υγιή άτομα (AUC = 0.784) και αυτό το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός βιοδείκτης του ορώδους καρκινώματος των ωοθηκών (72).

Άλλοι ερευνητές μελέτησαν μικροσυστοιχίες miRNAs χρησιμοποιώντας RNAs που απομονώθηκαν από ορό, ιστό και ασκτικό υγρό ασθενών με ορώδη καρκίνο των ωοθηκών και από έναν αρνητικό μάρτυρα και ταυτοποίησαν πέντε miRNAs (miR-132, miR-26a, let-7b, miR-145 και miR-143) ως τα πιο σημαντικά υποεκφραζόμενα miRNAs στον ορό των ασθενών σε σχέση με εκείνα της ομάδας των μαρτύρων (73). Οι Zheng και συν. αξιολόγησαν δείγματα πλάσματος από 360 ασθενείς με ΕΚΩ και από 200 υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα μαρτύρων. Βρήκαν υψηλότερη έκφραση του miR-205 στο πλάσμα και χαμηλότερη έκφραση του let-7f στους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών. Ο συνδυασμός δε των miR-205 και let-7f μαζί παρείχε υψηλή διαγνωστική ακρίβεια για τον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών (AUC = 0.831 (95 % CI, 0.772 - 0.880; ευαισθησία = 62.4 %, ειδικότητα = 92.9 %), ιδιαίτερα στους ασθενείς με νόσο σταδίου I, πράγμα που υποδεικνύει ότι αυτά τα δύο αποτυπώματα miRNA θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες ανίχνευσης του καρκίνου των ωοθηκών, ιδιαίτερα για το στάδιο I της νόσου (74).

Οι Suryawanshi και συν. επικεντρώθηκαν στον σχετιζόμενο με την ενδομητρίωση καρκίνο των ωοθηκών (ΕΑΟΚ, ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα ή διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα) και αποκάλυψαν ότι και τα τρία miRNAs στο πλάσμα, τα miR-16, miR-191 και miR-195 υπερεκφράζονταν στην ενδομητρίωση και θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν τις υγιείς από τις περιπτώσεις με ενδομητρίωση με 88% ευαισθησία και 60% ειδικότητα. Περαιτέρω έδειξαν ότι ένα συνδυασμός των miR-16, miR-21, και miR-191 θα μπορούσε να διάκριση μεταξύ υγιών και

ασθενών με ΕΑΟC με 86% ευαισθησία και 85% ειδικότητα και ότι ο συνδυασμός των miR-21, miR-191 και miR-195 μαζί θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη διάκριση μεταξύ ΕΑΟC και ορώδους καρκινώματος των ωοθηκών με 86% ευαισθησία και 79% ειδικότητα (75).

Μια άλλη ομάδα ερευνητών ανέφερε ότι το miR-200a είναι σημαντικά αυξημένο στα βλεννώδη αδενοκαρκινώματα συγκριτικά με τους άλλους ιστολογικούς τύπους, σε μια ομάδα ελέγχου 70 ασθενών με ΕΚΩ. Υψηλότερη τιμή της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC: area under curve) της σχετικής έκφρασης του αναφερόμενου miRNA ήταν: ευαισθησία 80.6% και ειδικότητα 73.5% (76).

Έγιναν και άλλες μελέτες, που έδειξαν ότι τα επίπεδα στον ορό των miR-25 και miR-93 υποεκφράζονταν, συγκριτικά με αυτά των miR-7 και miR-429 που υπερεκφράζονταν σε 180 ασθενείς με ΕΚΩ σε σύγκριση με 66 υγιείς μάρτυρες. Τα αποτυπώματα των τεσσάρων αυτών miRNAs διέκριναν τους ασθενείς με ΕΚΩ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα 93% και 92%, αντίστοιχα (77).

Η ομάδα Zhou και συν. ανέφερε τη διαγνωστική αξία των ανιχνεύσιμων στα ούρα miRNAs ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Εντόπισε σημαντική υπερέκφραση του miR-30a-5p στο δείγμα ούρων των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, όταν έκανε σύγκριση αυτού με υγιείς μάρτυρες. Προσδιόρισε επίσης ότι το miR-30a-5p ήταν συγκεντρωμένο στα εξωσώματα από υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων καρκίνου των ωοθηκών καθώς επίσης και στα ούρα από ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, γεγονός που υπαινίσσεται ένα μονοπάτι έκκρισης του miR-30a-5p στα ούρα (77).

Οι Καπετανάκης και συν. έδειξαν ότι το ανιχνεύσιμο στο πλάσμα miR-200b ήταν σημαντικά περισσότερο σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών από ότι σε αυτές με καλοήθεις όγκους. Έτσι, πρότειναν πιθανό ρόλο του miR-200b ως συμπληρωματικού βιοδείκτη του CA125, γιατί δεν ήταν στατιστικά σημαντική η συσχέτιση μεταξύ των κατανομών αυτών των δεικτών (78).

6.2. miRNAs ως ρυθμιστές των πρωτεϊνικών βιοδεικτών

Ο CA125, γνωστός και ως MUC16, είναι ο πιο γνωστός βιοδείκτης που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της εξέλιξης και της υποτροπής του ΕΚΩ (79). Έχει καθοριστεί

η πλήρης αλληλούχηση του cDNA που κωδικοποιεί το MUC16 γονίδιο (80) και σύμφωνα με αναλύσεις της βάσης δεδομένων της TCGA (The Cancer Genom Atlas Research network) και την υπάρχουσα βιβλιογραφία, ένας σημαντικός αριθμός miRNAs θα μπορούσε πιθανά να ρυθμίζει το γονίδιο MUC16 (Πίνακας 6). Για παράδειγμα, miRs, όπως τα miR-9 και miR-584 υποεκφράζονται στον καρκίνο των ωοθηκών, συγκριτικά με τη φυσιολογική ωοθήκη (23,81,82). Τα miR-124 και miR-637 βρέθηκαν, επίσης, να υποεκφράζονται σε κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών, συγκριτικά με την IOSE (Immortalized Ovarian Surface Epithelial) (19,23). Εφόσον αυτά τα miRNAs είναι πραγματικοί ρυθμιστές του CA125 και η ελαττωμένη έκφραση τους είναι ένας από τους μηχανισμούς που οδηγεί σε μη φυσιολογικά επίπεδα του CA125 στον καρκίνο των ωοθηκών, θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά με το CA125 για τη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών.

miRNAs	Chromosome Location	Targets	Deregulation in cancers	Potential link with chromosome abnormality in ovarian cancer
miR-9-2	5q14.3	CA125, NFκB	Down-regulated	Yes, deletion of 5q14 tumor suppressor loci
miR-9-3	15q26.1	CA125, NFκB	Down-regulated	Yes, deletion of 15q26 region
miR-124-1	8p23.1	CA125, EZH2	Down-regulated	Yes, deletion of 8p23 region
miR-324-3p	17p13.1	CA125	NA	Yes, LOH of 17p13 region
miR-544	14	CA125, cMYC	NA	Yes, loss of 14q region
miR-584	5q32	CA125, Rock1	Down-regulated	Yes, loss of 5q32 region
miR-625	14q23.3	CA125	NA	Yes, loss of 14q region
miR-637	19p13.3	CA125, LIF	Down-regulated	Yes, LOH of 19p13 region

Πίνακας 6. Πιθανή στόχευση του CA125 από τα miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών.

Η ανθρώπινη επιδιδυμική εκκριτική πρωτεΐνη 4 (human epididymis secretory protein 4, HE4) ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών WFCD2 (whey acidic four-disulfide core), που εκκρίνονται σε αυξημένα επίπεδα από το υγιές ενδομήτριο και από τους ενδομητριοειδείς και επιθηλιακούς καρκίνους των ωοθηκών (ΕΚΩ). Έχει επιβεβαιωθεί με μελέτες μικροσυστοιχιών ότι η HE4 υπερεκφράζεται στον καρκίνο των ωοθηκών

(83). Υπάρχει ένα προγνωστικό μοντέλο ROMA (risk of ovarian malignancy algorithm), βάση του οποίου χρησιμοποιείται ο συνδυασμός των δύο βιοδεικτών HE4 και CA125 για την κατεύθυνση (triage) ασθενών με πυελικές μάζες (84). Το HE4 γονίδιο εδράζεται στο 20q12-q13.2 χρωμόσωμα, χωρίς να υπάρχουν γνωστά χαρτογραφημένα miRNAs πάνω ή κοντά στην περιοχή αυτή. Μετά από ανάλυση με τον αλγόριθμο Targetscan, βρέθηκαν επτά θέσεις σύνδεσης miRNA στην 3'UTR περιοχή του HE4 γονιδίου. Από αυτά τα miRNAs, τα miR-140-5p και miR-409-5p εμφανίζουν ελαττωμένη έκφραση στους καρκίνους των ωοθηκών (85,86). Αυτά τα δύο miRNAs που ρυθμίζουν την έκφραση του HE4 γονιδίου, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως υποψήφιοι βιοδείκτες για την ανίχνευση και την παρακολούθηση του καρκίνου των ωοθηκών.

6.3. miRNAs ως προγνωστικοί δείκτες

Δεδομένου των ευρημάτων που προέρχονται από έρευνες που έχουν διενεργηθεί, η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs μπορεί ενδεχομένως να επηρεάσει τον καρκινικό φαινότυπο. Έτσι συγκεκριμένα προφίλ έκφρασης μπορούν να αποκαλύψουν τις διακριτές υποκατηγορίες των μορφών του καρκίνου. Η σύγχρονη διαχείριση του καρκίνου των ωοθηκών βασίζεται επάνω σε κλινικοπαθολογικούς παράγοντες, που περιλαμβάνουν, εκτός των άλλων, την ιστολογική ταυτοποίηση και τη σταδιοποίηση του όγκου. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν πως μεταβολές στα επίπεδα των κυκλοφορούντων miRNAs σχετίζονται με την πρόγνωση του καρκίνου των ωοθηκών (74,78,87,88), όπως συνοψίζονται στον Πίνακα 7.

Οι Zheng και συν. μέτρησαν τα επίπεδα του let-7 στο πλάσμα σε 360 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών σταδίου III και IV και έδειξαν ότι η χαμηλή έκφραση του let-7 σχετίζεται σημαντικά με πτωχή επιβίωση-χωρίς εξέλιξη (PFS: progression-free survival). Η Cox regression ανάλυση αποκάλυψε ότι ο let-7 ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης του καρκίνου των ωοθηκών στο PFS (74). Άλλοι ερευνητές μελέτησαν τα επίπεδα του miR-21 στον ορό, σε σύνολο 94 ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών. Έδειξαν ότι η αύξηση της έκφρασης του miR-21 σχετίζεται με προχωρημένο FIGO στάδιο, και υψηλά στάδια του όγκου, με μειωμένη συνολική επιβίωση (OS), και ότι το υψηλό επίπεδο έκφρασης στον ορό του miR-21 αποτελεί

δυσμενή προγνωστικό παράγοντα, ανεξάρτητο από άλλους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες **(88)**.

Οι Vaksman και συν. μελέτησαν την έκφραση miRNA σε εξωσώματα που προέρχονται από διάχυση μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Τα εξωσώματα συλλέχθηκαν από 66 κακοήγη περιτοναϊκά και 20 πλευριτικά διηθήματα από ένα σύνολο 86 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών προχωρημένου σταδίου. Έδειξαν ότι υψηλά επίπεδα miR-21, miR-23b και miR-29a σχετίζονταν με πτωχή πρόγνωση (PFS), σε μονοπαραγοντική στατιστική ανάλυση. Επιπλέον, η υψηλή έκφραση του miR-21 συσχετίστηκε με μειωμένη συνολική επιβίωση (OS) σε Cox regression ανάλυση **(87)**.

Οι Gao και συν. διερεύνησαν τις διαγνωστικές και προγνωστικές δυνατότητες των miR-200c και miR-141 του ορού, που είναι μέλη της οικογένειας miR-200, σε 74 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών. Και τα δύο miRNAs παρουσίαζαν σημαντική υπερέκφραση σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών σε σύγκριση με 50 υγιείς μάρτυρες. Ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης miR-200c πέτυχαν σημαντικά υψηλό ποσοστό επιβίωσης δύο ετών, ενώ η ομάδα με χαμηλή έκφραση miR-141 έδειξε ένα σημαντικά υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης **(89)**.

Αρκετές ερευνητικές ομάδες επικεντρώθηκαν στην ικανότητα των miRNAs να προβλέψουν την ευαισθησία στη θεραπεία. Μια από αυτές έδειξε ότι οι προ και μετά τη θεραπεία διακυμάνσεις του miR-200b, στο πλάσμα των ασθενών με καρκίνο, θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν πιθανό προγνωστικό παράγοντα. Δείγματα συλλέχθηκαν από ένα σύνολο 33 ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, πριν και μετά την πρωτοπαθή θεραπεία, χειρουργική και χημειοθεραπευτική. Ενώ η συγκέντρωση του CA125 επανήλθε στις φυσιολογικές τιμές μέσα στον πρώτο μήνα της θεραπείας σε όλους σχεδόν τους ασθενείς, ακόμα και σε αυτούς με μη χειρουργήσιμο όγκο, οι συγκεντρώσεις του miR-200b στο πλάσμα είχαν μεγάλες διακυμάνσεις. Οι ασθενείς με αρνητική διακύμανση του miR-200b είχαν καλύτερη PFS (progression-free survival) από αυτούς με θετική διακύμανση και ο κίνδυνος της εξέλιξης της νόσου ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με θετική διακύμανση σε σχέση με αυτούς με αρνητική διακύμανση **(78)**.

Table 2 Circulating miRNAs as potential prognostic predictors of ovarian cancer

Reference	miRNAs associated with poor prognosis		Endpoint	Source	Patients (n)	Histology (n)		FIGO stage (n)	
	Increased miRNAs	Decreased miRNAs				Serous	Others	I-II	III-IV
[69], 2013		let-7f	PFS	Plasma	360	179	181	133	227
[71], 2013	miR-21		OS	Serum	94	68	26	32	62
[72], 2013	miR-221		OS	Serum	96	70	26	32	64
[74], 2014		miR-1290	OS	Plasma	26	26	0	6	36
[38], 2014	miR-21, miR-23b, miR-29a (PFS), miR-21(OS)		PFS/OS	Effusion (exosome)	86	76	10	0	86
[75], 2015	miR-429		OS	Serum	180	180		32	147
[76], 2015	miR-141	miR-200c	OS	Serum	74	16	58	54	20
[77], 2015		miR-145	OS	Serum	82	18	64	31	53
[80], 2015	miR-200b		PFS	Plasma	33	33		Unknown	

FIGO: International Federation of Obstetrics and Gynecology, PFS: progression free survival, OS: overall survival

Πίνακας 7. Κυκλοφορούντα miRNAs ως πιθανοί προγνωστικοί δείκτες του καρκίνου των ωοθηκών.

Η ομάδα Benson και συν. διεξήγαγε μια πιλοτική μελέτη με στόχο να βρεθούν miRNAs που θα μπορούσαν να προβλέψουν το αποτέλεσμα της χορήγησης μιας συγκεκριμένης θεραπευτικής αγωγής της carboplatin σε συνδυασμό με decitabin. Για το λόγο αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα 14 ασθενών με υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών ανθεκτικό στην πλατίνη, στην αρχή και στο τέλος του πρώτου κύκλου της θεραπείας και αξιολογήθηκαν οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις του miRNA. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα του miR-148b-5p, σχετίζονταν με χειρότερο PFS, υπογραμμίζοντας την προοπτική να χρησιμοποιηθεί σαν ένας πιθανός βιοδείκτης της θεραπευτικής ανταπόκρισης (90).

Σύμφωνα και με άλλα τρέχοντα δεδομένα, η ελαττωμένη έκφραση του ογκοκατασταλτικού miR-9 σε υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών έχει σχετιστεί με την υποτροπή του όγκου (91). Η χαμηλή έκφραση του miR-31 αποτελεί δείκτη υποτροπής και μετάστασης της νόσου. Η αυξημένη έκφραση των miR-15a, miR-21 και miR-92 έχει επίσης σχετιστεί με υποτροπή της νόσου. Η ελαττωμένη έκφραση των miR-34a/b/c, miR-449b, miR-503 και miR-507 έχει παρατηρηθεί σε καρκίνο ωοθηκών τελικού σταδίου και υψηλής κακοήθειας (74,75,92).

6.4. miRNAs και χημειοαντοχή

Οι σύγχρονες θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών περιλαμβάνουν χειρουργική εκτομή του όγκου, ακολουθούμενη από χημειοθεραπεία. Τα φάρμακα πρώτης γραμμής που χρησιμοποιούνται είναι ένας

συνδυασμός της καρβοπλατίνης (αλκυλιωτικός παράγοντας που περιέχει πλατίνα) και της πακλιταξέλης (παράγοντας που στοχεύει στους μικροσωληνίσκους). Καθώς οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο, το υψηλό ποσοστό καλής ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία, στο στάδιο I, επισκιάζεται από την υποτροπή της νόσου και τη θνησιμότητα των ασθενών που διαγιγνώσκονται καθυστερημένα. Η υποτροπή του καρκίνου οφείλεται σε ένα σημαντικό βαθμό στην απώλεια της ευαισθησίας στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Τα miRNAs φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντοχή αυτή (93). Η μεταβολή στην έκφραση της β-tubulin τάξης III (TUBB3) είναι ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων τα ωθητικά καρκινικά κύτταρα αποκτούν αντίσταση στους φαρμακευτικούς παράγοντες που στοχεύουν τους μικροσωληνίσκους (94-96). Έχει βρεθεί ότι το miR-200c συνδέεται στην 3'UTR του TUBB3 και ελαττώνει την έκφραση του, ευαισθητοποιώντας έτσι τα κύτταρα στην πακλιταξέλη, καθώς επίσης και σε άλλους παράγοντες που στοχεύουν τους μικροσωληνίσκους, όπως η βινκριστίνη και η εποθιλόνη (97,98). Σε μελέτες που ακολούθησαν φάνηκε πως και άλλα μέλη της οικογένειας miR-200 μπορούν να ρυθμίζουν τα επίπεδα TUBB3 (99). Κατά συνέπεια η χαμηλή έκφραση του miR-200 βρέθηκε ότι είναι ένας δείκτης πτωχής επιβίωσης και αντίστασης στην πακλιταξέλη σε ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών (99,100). Παρόλα αυτά, μελέτες που έγιναν στην πορεία και αφορούσαν την αλληλεπίδραση του miR-200c και TUBB3, καθώς και της πρωτεΐνης HuR, ανέδειξαν την πολυπλοκότητα του μηχανισμού αυτού. Η κυτταροπλασματική HuR προκαλεί σταθεροποίηση και αυξάνει τα επίπεδα της TUBB3 (100), σε συνδυασμό με το miR-200c (101), οδηγώντας σε πτωχή επιβίωση. Αυτό είναι σε πλήρη αντίθεση με προηγούμενα ευρήματα και οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση ενός μοντέλου που περιγράφει τους δύο διαφορετικούς μηχανισμούς με τους οποίους το miR-200c ρυθμίζει το TUBB3mRNA στον καρκίνο των ωθηκών. Βάσει αυτού του μοντέλου, όταν η HuR εντοπίζεται στον πυρήνα, υπερεκφράζεται το miR-200c οδηγώντας σε μείωση της έκφρασης της TUBB3.

Από την άλλη πλευρά, η κυτταροπλασματική HuR προκαλεί μία, επαγόμενη από το miR-200c, αύξηση της TUBB3, οδηγώντας σε αντοχή στην πακλιταξέλη. (101).

Μελέτες που έγιναν σε μοντέλα ποντικών, έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα των miR-141 και miR-200a, οδηγούσαν στην αύξηση του όγκου (128). Παρόλα αυτά, τα

miRNAs ήταν εξίσου υπεύθυνα για την καταστολή της p38α (η οποία απαντά στο οξειδωτικό στρες), που φάνηκε να βελτιώνει τα κλινικά αποτελέσματα. Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ευαισθητοποίηση των κυττάρων στη θεραπεία με πακλιταξέλη και ότι τα κύτταρα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες έχουν καλύτερη ανταπόκριση στην πακλιταξέλη (129,130).

Αυτό το παράδοξο οδήγησε τους ερευνητές να προτείνουν ένα μοντέλο που να εξηγεί την αλληλεπίδραση μεταξύ των miR-200, p38α και ROS. Στα φυσιολογικά κύτταρα, υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των τριών αυτών παραγόντων (128). Σε ένα νεοπλασματικό κύτταρο που ακόμα βρίσκεται στα πρώτα στάδια του μετασχηματισμού, υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση ROS, που οδηγεί στην προς τα επάνω ρύθμιση των miRNAs, που με τη σειρά τους καταστέλλουν την p38α. Αυτές οι καταστάσεις προκαλούν μια κατάσταση οξειδωτικού στρες, η οποία βελτιώνει την ευαισθησία στην πακλιταξέλη. Καθώς ο όγκος εξελίσσεται, ρύθμιση προς τα κάτω των miRNAs αποκαθιστά την έκφραση της p38α, ωθώντας έτσι τα κύτταρα να καταστούν ανθεκτικά στην πακλιταξέλη.

Συνολικά 27 miRNAs έχουν σχετιστεί με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (102). Σύμφωνα με μελέτες βρέθηκε ότι το miR-214, που στοχεύει το PTEN, εκφράζεται συχνά στους καρκινικούς ιστούς της ωοθήκης και ότι το let-7i, το οποίο ενισχύει την επανευαισθητοποίηση στην αντοχή στην πλατίνα, εκφράζεται λιγότερο στους ίδιους ιστούς (103). Σύμφωνα με τους Mitamura και συν., το miR-31 που συμμετέχει στη διαδικασία της μεσεγχυματικο-επιθηλιακής μετάβασης (MET), σχετίζεται με αντοχή των καρκινικών κυττάρων στην πακλιταξέλη (104). Άλλα miRs, όπως τα miR-15 και miR-16, προκαλούν κυτταρική αντίσταση σε πολλά φάρμακα, μέσω της στόχευσης του γονιδίου BCL2 (105). Η ομάδα του Leskelä έδειξε ότι η οικογένεια των miR-200 (miR-141, miR-200a/b/c και miR-42) εμπλέκεται στην ανταπόκριση στη θεραπεία με πακλιταξέλη και στην PFS, μέσω της ρύθμισης της β-tubulin III (Πίνακας 8). Ειδικότερα, το miR-200c, σχετίζεται σημαντικά με την υποτροπή του καρκίνου των ωοθηκών και το miR-429 με την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) και την ολική επιβίωση (OS) (106).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι ταξάνες και η σισπλατίνη είναι από τα πιο σημαντικά φάρμακα ενάντια στον καρκίνο των ωοθηκών. Από τα miRs που έχουν μελετηθεί, τα

let-7g και let-7a είναι ακόμα δύο miRs που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη αντοχής στα χημειοθεραπευτικά (107). Ο let-7g καταστέλλει την IMP-1, η οποία συνδέεται με την αντοχή σε πολλά φάρμακα και με αυξημένη ευαισθησία στις ταξάνες. Τα επίπεδα έκφρασης του let-7a μπορεί να αποτελέσουν έναν καλό βιοδείκτη για την επιλογή του κατάλληλου χημειοθεραπευτικού παράγοντα, καθώς ασθενείς με πολύ χαμηλά επίπεδα let-7a ανταποκρίνονται στη θεραπεία με πλατίνα και πακλιταξέλη, ενώ οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα let-7a είχαν αυξημένη επιβίωση μόνο στη μονοθεραπεία με πλατίνα (108).

Ένα άλλο miR που μελετήθηκε, το miR-100, ένα ογκοκατασταλτικό miRNA, ενίσχυσε την ευαισθησία στο everolimus (αντικαρκινικό φάρμακο) (109,110). Αποτελεί επίσης έναν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Μια ακόμα ερευνητική ομάδα έδειξε ότι το miR-376c καταστέλλει την ALK7 (Nodal/activin receptor-like kinase 7), που σχετίζεται με την ευαισθησία στα φάρμακα, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της σισπλατίνης και της καρβοπλατίνης. Σε ότι αφορά την αντοχή στη σισπλατίνη το miR-93 στοχεύει στην ιντεγκρίνη και ενισχύει την ανάπτυξη του όγκου, την αγγειογένεση και την αντοχή στη σισπλατίνη (111).

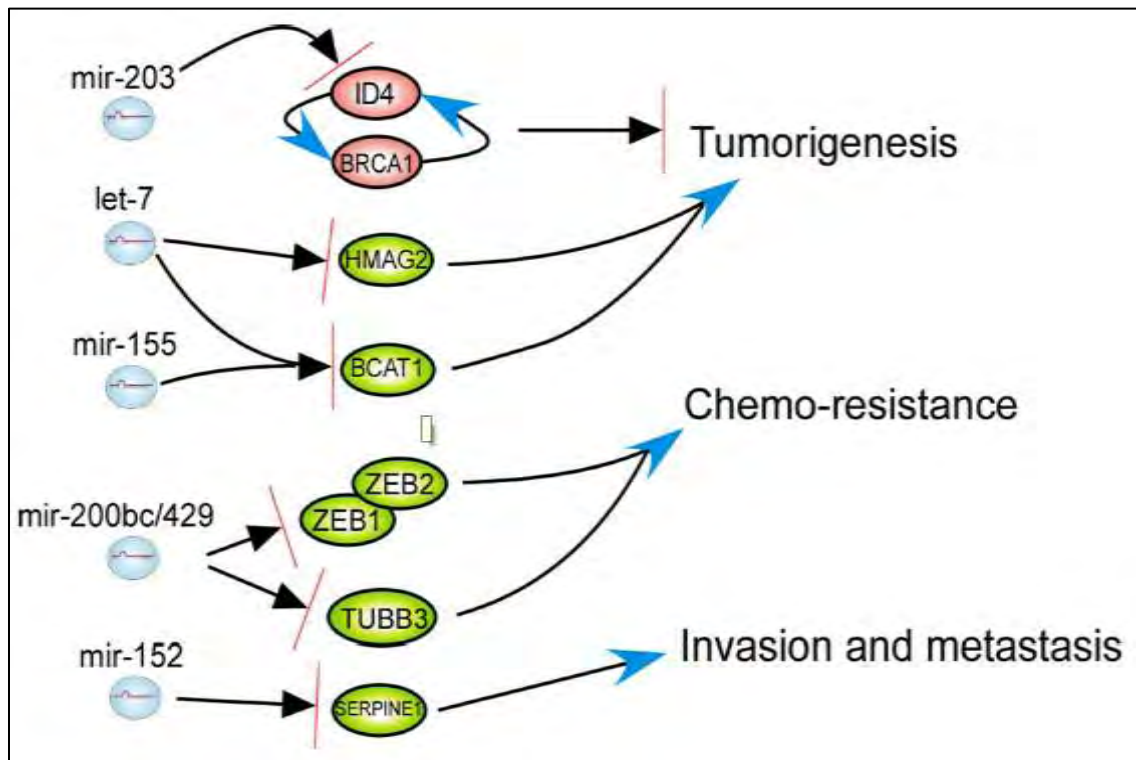
miRNAs	Target gene	Function	Up/down-regulated	References
MiR-200 family	<i>ERRFI-1</i>	Inhibits the expression of TGF- β , ZEB1, and ZEB2	Down-regulated	47
MiR-200c	<i>ZEB1, ZEB2, and TUBB3</i>	MiR-200c restores chemosensitivity through inhibition of TUBB3	Up-regulated	48
MiR-21	<i>PTEN, PDCD4</i>	Promotes cell proliferation, invasion and migration by targeting PI3/Akt pathway	Up-regulated	59
MiR-214	<i>PTEN</i>	Induces cisplatin resistance through targeting PTEN	Up-regulated	58
MiR-100	<i>mTOR, PLK-1</i>	Increases sensitivity towards chemotherapy	Down-regulated	60
MiR-34a/b/c	<i>c-myc, CDK6, MET, E2f3, Bcl2, cyclinD1</i>	Reduces invasion/migration/proliferation	Down-regulated	54
MiR-376c	<i>ALK7</i>	Induces ALK7 and inhibits apoptosis		62
MiR-30c, miR-30d, miR30e-3p and miR-532-5p	<i>HER-2/neu oncogene</i>	Targets Her2/neu oncogene via MAPK (ERK1/2) pathways	Down-regulated	72
Let-7 family	<i>HMG2, Min-41, and IMP-1, KRAS, HRAS, C-MYC</i>	Re-expression of embryonic mesenchymal genes and de-differentiation of cancer cells	Down-regulated	38-43
MiR-141 and miR-200a	<i>p38 α</i>	Modulate the oxidative stress response in ovarian cancer	Up-regulated	88

Πίνακας 8. Ο ρόλος διάφορων υπερ- και υποεκφραζόμενων miRNAs στη διάγνωση, στην πρόγνωση και στη χημειοαντοχή του καρκίνου των ωοθηκών.

6.5. miRNAs ως θεραπευτικοί στόχοι

Τα miRs ρυθμίζουν την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων και μπορούν να λειτουργήσουν ως κύριοι συντονιστές για πολλά κυτταρικά μονοπάτια και διαδικασίες.

Πολλοί στόχοι των miRNAs έχουν ανιχνευτεί (**Εικόνα 8**). Στοχεύοντας στο miR-203, μπορεί ταυτόχρονα να αποκατασταθεί το BRCA1-ID4 ρυθμιστικό κύκλωμα και η έκφραση του ARHI στον καρκίνο των ωοθηκών. Τα let-7, miR-125b, miR-155 και miR-152 μπορούν να καταστείλουν τη γένεση του όγκου και τη μετάσταση, στοχεύοντας στο BCAT1 και στη SERPINE1. Επιπρόσθετα, περίπου 50 απορρυθμισμένα miRNAs έχουν σχετιστεί με χημειοαντοχή ή χημειοευαισθησία στις ταξάνες ή στις χημικές ενώσεις της πλατίνας (**49**). Η υπερέκφραση των miR-27a και miR-514, καθώς και η ελαττωμένη έκφραση του let-7e έχουν σχετιστεί με ανάπτυξη αντοχής στις ταξάνες και στην πλατίνα. Η έκφραση του miR-214 μπορεί να επάγει την αντοχή στην πλατίνα, μέσω της επίδρασης στο PTEN (ογκοκατασταλτικό γονίδιο) (**50**). Αντίθετα, η αύξηση της έκφρασης των miR-378 και miR-625 έχει σχετιστεί με ευαισθησία στην πλατίνα.



Εικόνα 8. Πιθανή λειτουργία των απορρυθμισμένων miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών. Αυξημένη έκφραση του miR-203 μπορεί να εμποδίσει την έκφραση του ID4, διαταράσσοντας με αυτόν τον τρόπο την BRCA1-ID4 ρυθμιστική αγκύλη, η οποία εξασφαλίζει τον κατάλληλο κύκλο έκφρασης των 2 αυτών γονιδίων κατά την διάρκεια της κανονικής κυτταρικής διαίρεσης. Μειωμένη έκφραση της οικογένειας let-7 και του miR-155 ίσως ευθύνεται για την υπερέκφραση του ογκογονιδίου BCAT1, το οποίο αποτελεί άμεσο στόχο του c-Myc. Επίσης, χαμηλά επίπεδα του let-7 επάγουν την αύξηση της έκφρασης εμβρυονικών γονιδίων, όπως το HMAG2, τα οποία ευθύνονται για την ογκογένεση. Μείωση της έκφρασης των ZEB1/2 και TUBB3 από τα miR-200b/c και miR-429, μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία στην paclitaxel των καρκινικών κυττάρων. Το miR-152 μπορεί να καταστείλει τον όγκο, στοχεύοντας την SERPINE1, η οποία είναι καταστολέας της ινωδόλυσης και εμπλέκεται στη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων και στη μετάσταση. Το βέλος υποδεικνύει ενεργοποίηση, ενώ το βέλος με κάθετη γραμμή υποδεικνύει παρεμπόδιση.

6.6. miRNAs ως βιοδείκτες ανταπόκρισης ή μη στη θεραπεία

Όπως προαναφέρθηκε, τα miRNAs παίζουν ρόλο στην έναρξη, την εξέλιξη, τη μετάσταση και τη χημειοαντοχή του καρκίνου των ωοθηκών. Συνεπώς, η στόχευση τους θα μπορούσε να συνεισφέρει στη θεραπεία. Παρατηρήθηκε πως η επιμόλυνση (transfection) ωοθηκικών καρκινικών κυττάρων (A2780) που εμφανίζουν αντοχή στην πακλιταξέλη, με αναστολείς του miR-27a ελαττώνει την έκφραση των MDR1 mRNA και P-gp πρωτεΐνης, αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης HIPK2, βελτιώνοντας τελικά την ευαισθησία στην πακλιταξέλη (46). Η εξωγενής έκφραση του miR-31 εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (ανεξάρτητη από την p53) (47). Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι όλοι οι υψηλής κακοήθειας ΕΚΩ χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια της p53, η θεραπεία με miR-31 θα μπορούσε να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε αυτόν τον τύπο καρκίνου (47). Τα miR-152 και miR-185, στοχεύοντας στο DNMT1, μπορούν δυνητικά να αυξήσουν την ευαισθησία του καρκίνου των ωοθηκών στη σισπλατίνη in vitro και in vivo (48).

6.7. Θεραπεία

Οι θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών συνίστανται είτε στη ενίσχυση με miRNAs που υποεκφράζονται σε καρκινικούς ιστούς ώστε να αποκατασταθεί η λειτουργία τους, είτε στην παρεμπόδιση της λειτουργίας των miRNAs που υπερεκφράζονται, μέσω της χορήγησης συμπληρωματικών νουκλειικών οξέων. Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, τα αποτελέσματα από την υπερέκφραση των ογκογόνων miRs (oncomiRs) θα μπορούσαν να κατασταλούν χρησιμοποιώντας έναν ‘καταστολέα’ antago-miR, ένα ολιγονουκλεοτίδιο συμπληρωματικό προς το miRNA, που χορηγείται ως ένα αντινοσηματικό νουκλεοτίδιο (antisense oligonucleotide) ή LNA (112).

Οι Lu και συν. χρησιμοποίησαν ένα αντι-miRNA αντινοσηματικό ολιγοδεοξυριβονουκλεοτίδιο (anti-miRNA antisense oligodeoxyribonucleotide, MTG-AMO) για την καταστολή πολλών miRNAs, μεταξύ των οποίων και το miR-21 και έδειξαν ότι αυτό ήταν αποτελεσματικό στον καρκίνο (113). Άλλοι ερευνητές σχεδίασαν μια θεραπεία για τον καρκίνο των ωοθηκών βασισμένη στη στοχευμένη μεταφορά του miR-29a στους καρκινικούς ιστούς, με στόχο την επανέκφραση του PTEN, το οποίο έχει ογκοκατασταλτική δράση. Η σημαντική ογκοκατασταλτική δράση

του χιμαιρικού miR-29a βασίζεται στην έκφραση μορίων σηματοδοτικών μονοπατιών και στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (114).

Παράλληλα, μελετήθηκε η συσχέτιση των miRNAs με την περιτοναϊκή μετάσταση, τη βασική αιτία θανάτου στους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών. Επιστήμονες βρήκαν ότι η ιντεγκρίνη α5, ένας υποδοχέας της ινωδονεκτίνης, αυξάνει την προσκολλητικότητα των καρκινικών κυττάρων και προκαλεί μετάσταση και επικεντρώθηκαν στην αντίστροφη συσχέτιση της ιντεγκρίνης α5 και των επιπέδων του miR-92a. Η επιμόλυνση των καρκινικών κυττάρων της ωοθήκης με το miR-92a μείωσε την έκφραση της ιντεγκρίνης α5 και κατέστειλε την περιτοναϊκή μετάσταση (115) (Πίνακας 9).

Οι Cittelly και συν. βρήκαν ότι η επαναφορά των επιπέδων του miR-200c, που ως γνωστό αυξάνει την ευαισθησία στα παράγωγα της πλατίνης, κατέστειλε την καρκινογένεση και μείωσε τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, η επαναφορά του miR-200c σε συνδυασμό με την πακλιταξέλη, μείωσε τα καρκινικά κύτταρα στους εγκατεστημένους όγκους. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η επαναφορά του miR-200c, αμέσως πριν από τη χορήγηση πολύ κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας αυξάνει την ανταπόκριση στην θεραπεία ή ακόμα μπορεί και να μειώσει τη θεραπευτική δόση των αντικαρκινικών φαρμάκων (116).

Τα χορηγούμενα (transfected) miRNAs είναι συνθετικά νουκλεϊκά οξέα που απαιτούν συγκεκριμένο τρόπο χορήγησης (117-119), όπως ενδογενή χορήγηση με σύμπλεγμα από ατελοκολλαγόνο, κυτταροειδικά νανοσωματίδια και σύζευξη με πεπτίδιο RVG για προσπέλαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η γονιδιακή θεραπεία για την εισαγωγή των miRNAs μπορεί επίσης να αποδειχτεί χρήσιμη, εφόσον βέβαια εξασφαλίζεται η ασφάλεια.

Η επιγενετική θεραπεία έχει προσελκύσει την προσοχή ως μια εναλλακτική λύση στις κλασικές μεθόδους, όπως η επιμόλυνση με miRNAs. Η ανάπτυξη αντοχής στα χημειοθεραπευτικά, μειώνει το προσδόκιμο επιβίωσης, ενώ υπάρχουν και πολλές περιπτώσεις που τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αντοχή στα χημειοθεραπευτικά παράγωγα της πλατίνης. Αυτή η αντοχή σχετίζεται με τα miRNAs και με διάφορα χημειοανθεκτικά γονίδια που επάγονται από τη μεθυλίωση και από την αποσιώπηση των γονιδίων. Παρόλα αυτά οι επιγενετικές αλλαγές είναι αναστρέψιμες, σε αντίθεση

miRNA	Target gene	Cellular function	Ovarian cancer cell line	Reference	
miR-200 family	miR-141	KEEPI	Cisplatin resistance	A2780 (EOC), TOV112D (EAC), TOV21G (CAC)	[61]
	miR-141, miR-200a	MAPK14	Oxidative stress response, paclitaxel sensitivity	SKOV3 (EOC)	[55]
	miR-200a	ZEB2	EMT, stemness, migration, invasion	OVCAR3 (EOC)	[56]
	miR-200c	ZEB1, TUBB3	EMT, stemness, adhesion, migration, invasion, paclitaxel sensitivity	HEY (SAC), SKOV3 (EOC)	[57, 59, 60]
	miR-200a, miR-200b	IL8, CXCL1	Angiogenesis	HeyA8 (SAC), ES2 (CAC)	[58]
miR-199/214 cluster	miR-199a-5p	IKKB, HIF-1A, HIF-2A	Inflammation, chemosensitivity, migration, metastasis	A2780 (EOC), R454 (EOC), 01-28 (EOC), R182 (EOC), 01-19B (EOC), R1185 (EOC), primary culture	[62, 63, 67]
	miR-199a-3p	CD44	Stemness, chemosensitivity	primary culture	[64]
	miR-199b-5p	JAG1	Cisplatin sensitivity	A2780 (EOC), OV119 (EOC)	[65]
	miR-214	PTEN, CCL5	Proliferation, cell survival, cisplatin resistance, CAFs activity	A2780 (EOC), HeyA8 (SAC), SKOV3ip1 (EOC), OV119 (EOC), primary culture	[63, 66, 87]
let-7	HMGA2	Carcinogenesis	A2780 (EOC), HeyA8 (SAC), IGROV-1 (EOC)	[69, 70]	
miR-506	SNAI2	EMT	HeyA8 (SAC), SKOV3 (EOC), OVCA420 (EOC), OVCA433 (EOC)	[26]	
	CDK4, CDK6	Proliferation, senescence	HeyA8 (SAC), SKOV3 (EOC), OVCA432 (EOC), OVCA433 (EOC)	[73]	
miR-92a	ITGA5	Adhesion, invasion, proliferation	A2780 (EOC), SKOV3ip1 (EOC), OVISE (CAC)	[74]	
miR-31	MET	Paclitaxel sensitivity	KFr13 (EOC)	[76]	
	CEBPA, STK40, E2F2	Proliferation	SKOV3 (EOC), OVCAR8 (EOC), OVCA433 (EOC)	[77]	
miR-484	VEGFB, VEGFR2	Angiogenesis	SKOV3 (EOC), MDAH-2274 (EOC)	[78]	
miR-502d-3p	EPHA2, EPHB2	Proliferation, migration, invasion	HeyA8 (SAC), SKOV3ip1 (EOC), ES2 (CAC)	[79]	
miR-155	SATB1, CD200	DCs activity	ID8 (EOC, mouse)	[90]	

CAF: cancer associated fibroblasts; EMT: epithelial-mesenchymal transition; DCs: dendritic cells; EOC: epithelial ovarian cancer; EAC: endometrioid adenocarcinoma; CAC: clear cell adenocarcinoma; SAC: serous adenocarcinoma.

CAF: cancer associated fibroblasts; EMT: epithelial-mesenchymal transition; DCs: dendritic cells; EOC: epithelial ovarian cancer; EAC: endometrioid adenocarcinoma; CAC: clear cell adenocarcinoma; SAC: serous adenocarcinoma.

Πίνακας 9. Πιθανή θεραπευτική δράση των miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών.

με τις γονιδιακές μεταλλάξεις και υπάρχει η δυνατότητα για αντιστροφή της γονιδιακής αποσιώπησης, με τη χρήση αναστολέων της DNA μεθυλτρανσφεράσης (DNMT), που είναι φάρμακα που εμποδίζουν την υπερμεθυλίωση, μέσω της αντίστροφης σύνδεσης τους με την ενεργή περιοχή της DNMT (**120**). Αυτά τα φάρμακα είναι αποτελεσματικά ως μονοθεραπεία για αιματολογικές κακοήθειες, αλλά όχι για συμπαγή όγκο. Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητά τους σε συμπαγή όγκο μπορεί να υπάρξει σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα. Στον καρκίνο των ωοθηκών οι αναστολείς DNMT επάγουν υπομεθυλίωση και αντίστροφη αντίσταση στα

χημειοθεραπευτικά φάρμακα της πλατίνας. Οι φάσεις I και II των κλινικών δοκιμών της decitabine (αναστολέας DNMT) βρίσκονται σε εξέλιξη (**121,122**).

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών παρουσιάζει αξιοσημείωτη ετερογένεια. Αυτή η ετερογένεια αντικατοπτρίζεται στην απορρύθμιση της έκφρασης διαφόρων miRNAs. Αυτό σημαίνει ότι το προφίλ των miRNAs διαφέρει μεταξύ των υψηλής και χαμηλής κακοήθειας καρκίνων. Από τη μια πλευρά τα miRNAs ρυθμίζονται από μεταβολές στα αντίγραφα του DNA, μεθυλίωση, ακετυλίωση ιστονών και μετάλλαξη στο TP53 γονίδιο. Από την άλλη, τα miRNAs ρυθμίζουν τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 και εντυπωμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως ARHI (DIRAS3). Απώλεια κάποιων miRNAs προκαλεί υπερέκφραση κάποιων καρκινικών βιοδεικτών, όπως ο CA125 και ο HE4. Οι αλλαγές στην έκφραση των miRNAs μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες για την ανίχνευση, την παρακολούθηση, τον καθορισμό της πρόγνωσης και την απάντηση στην κλασσική θεραπεία. Καθώς αναπτύσσονται μέθοδοι διαχείρισης των miRNAs στο εργαστήριο, συγκεκριμένα miRNAs μπορούν να αποτελέσουν στόχο για θεραπεία.

8. ΣΥΝΟΨΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γεγονός ότι τα miRNAs αποτελούν έναν πολλά υποσχόμενο βιοδείκτη για την έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση και ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών. Παρόλα αυτά, οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα βρίσκονται ακόμα σε προκαταρκτικό στάδιο, αφού βασίζονται στην ταυτοποίηση των επιπέδων των απορρυθμισμένων miRNAs σε ένα σχετικά μικρό δείγμα ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι δεν υπάρχουν συγκριτικές μελέτες που να συσχετίζουν τις κλασσικές διαγνωστικές μεθόδους (CA125 και υπέρηχους) με τα miRNAs, ειδικότερα στα αρχικά στάδια της νόσου.

Επιπλέον, η έλλειψη σταθερών πρωτοκόλλων σε ότι αφορά τη συλλογή των δειγμάτων, την εξαγωγή του RNA και την επιλογή κατάλληλης ομάδας ελέγχου (control), δυσχεραίνει τη συγκριτική συσχέτιση των αποτελεσμάτων στις υπάρχουσες μελέτες.

Τέλος, παρατηρείται μεγάλη διαφοροποίηση σε ότι αφορά τα ευρήματα που προκύπτουν από τις διάφορες μελέτες. Απαιτούνται πιο εκτεταμένες και προτυποποιημένες έρευνες, ώστε να αναδειχθεί η μεγάλη κλινική σημασία των miRNAs και να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον όχι μόνο ως βιοδείκτες, αλλά και ως ικανοί θεραπευτικοί στόχοι.

9. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ε. Προδρομάκη. Μοριακοί μηχανισμοί που ενέχονται στην παθογένεια του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα με έμφαση στο ρόλο των ρυθμιστών των *microRNAs*, *DROSHA*, *DICER* και *AGO2*. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών 2013
2. Zimmerman AL, Wu S. *MicroRNAs, cancer and cancer stem cells*. *Cancer Lett* 2011, 300:10–19
3. Leigh-Ann MacFarlane and Paul R Murphy. *MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer*. *Current Genomics* 2010; 11: 537-561
4. Ε. Σκούρτη, Ι. Χριστοδούλου, Σ. Λογοθέτη, Γ. Ζουμπουρλής. *MicroRNAs, καρκίνος και καρκινικά βλαστοκύτταρα. Από την έρευνα στη θεραπεία. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2013; 30: 391-405
5. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E et al. *Frequent deletions and down-regulation of microRNA genemiR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:15524–15529
6. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD et al. *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:11755–11760
7. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M et al. *MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:13944–13949
8. Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, Croce CM. *MicroRNAs in human cancer: From research to therapy*. *J Cell Sci* 2007; 120:1833–1840
9. Γ. Κρεατσάς, Σ. Φωτίου. *Επιθηλιακός καρκίνος ωοθηκών. Σύγχρονη Γυναικολογία & Μαιευτική* 2009; σελ. 269-280
10. Γ. Δ. Βλάχος. *Καρκίνος των ωοθηκών*. 2015
11. Andrew E Green, MD; Chief Editor: from Memorial Sloan-Kettering - Yukio Sonoda, MD. <http://emedicine.medscape.com/article/255771-overview#a5>
12. *Καρκίνος των ωοθηκών: ένας οδηγός για ασθενείς. Πληροφορίες για ασθενείς βασισμένες στις κατευθυντήριες οδηγίες κλινικής πρακτικής της ESMO v.2014.1*
13. Reade CJ, McVey RM, Tone AA, Finlayson SJ, McAlpine JN, Fung-Kee-Fung M, et al. *The fallopian tube as the origin of high grade serous ovarian cancer: review of a paradigm shift*. *J Obstet Gynaecol Can*. 2014 Feb. 36 (2):133-40. [Medline]
14. Vaksman O, Stavnes HT, Kaern J, Trope CG, Davidson B, Reich R. *miRNA profiling along tumor progression in ovarian carcinoma*. *J Cell Mol Med*. 2010
15. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:2999–3004. [PubMed: 14973191]
16. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. *microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:9136–9141. [PubMed: 16754881]

17. Flavin R, Smyth P, Barrett C, Russell S, Wen H, Wei J, et al. *miR-29b expression is associated with disease-free survival in patients with ovarian serous carcinoma.* *Int J Gynecol Cancer.* 2009; 19:641–647. [PubMed: 19509563]
18. Creighton CJ, Fountain MD, Yu Z, Nagaraja AK, Zhu H, Khan M, et al. *Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers.* *Cancer Res.* 2010; 70:1906–1915. [PubMed: 20179198]
19. Zhang L, Volinia S, Bonome T, Calin GA, Greshock J, Yang N, et al. *Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:7004–7009. [PubMed: 18458333]
20. Corney DC, Hwang CI, Matoso A, Vogt M, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, et al. *Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers.* *Clin Cancer Res.* 2010; 16:1119–1128. [PubMed: 20145172]
21. Creighton CJ, Hernandez-Herrera A, Jacobsen A, Levine DA, Mankoo P, Schultz N, et al. *Integrated analyses of microRNAs demonstrate their widespread influence on gene expression in high-grade serous ovarian carcinoma.* *PLoS One.* 2012; 7:e34546. [PubMed: 22479643]
22. Nakayama K, Nakayama N, Jinawath N, Salani R, Kurman RJ, Shih Ie M, et al. *Amplicon profiles in ovarian serous carcinomas.* *Int J Cancer.* 2007; 120:2613–2617. [PubMed: 17351921]
23. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, et al. *MicroRNA signatures in human ovarian cancer.* *Cancer Res.* 2007; 67:8699–8707. [PubMed: 17875710]
24. Lee CH, Subramanian S, Beck AH, Espinosa I, Senz J, Zhu SX, et al. *MicroRNA profiling of BRCA1/2 mutation-carrying and non-mutation-carrying high-grade serous carcinomas of ovary.* *PLoS One.* 2009; 4:e7314. [PubMed: 19798417]
25. Aletti GD, Gallenberg MM, Cliby WA, Jatoi A, Hartmann LC. *Current management strategies for ovarian cancer.* *Mayo Clin Proc.* 2007; 82:751–770. [PubMed: 17550756]
26. Pastrello C, Polesel J, Della Puppa L, Viel A, Maestro R. *Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients.* *Carcinogenesis.* 2010; 31:2124–2126. [PubMed: 20810544]
27. Calura E, Fruscio R, Paracchini L et al., “miRNA landscape in stage I epithelial ovarian cancer defines the histotype specificities”, *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 15, pp. 4114–4123, 2013
28. Nam EJ, Yoon H, Kim SW et al., “MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma,” *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 9, pp. 2690–2695, 2008
29. Vang S, Wu HT, Fischer A et al., “Identification of ovarian cancer metastatic miRNAs,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3, Article ID e58226, 2013

30. Cancer Genome Atlas Research Network, "Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma," *Nature*, vol. 474, no. 7353, pp. 609–615, 2011
31. Yang D, Sun Y, Hu L et al., "Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer," *Cancer Cell*, vol. 23, no. 2, pp. 186–199, 2013
32. Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* (2005) 65(8):3025–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3931
33. Chen D, Zhang Y, Wang J, Chen J, Yang C, Cai K, et al. microRNA-200c over-expression inhibits tumorigenicity and metastasis of CD117+CD44+ ovarian cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *J Ovarian Res* (2013) 6(1):50. doi:10.1186/1757-2215-6-50
34. Wu Q, Guo R, Lin M, Zhou B, Wang Y. microRNA-200a inhibits CD133/1+ ovarian cancer stem cells migration and invasion by targeting E-cadherin repressor ZEB2. *Gynecol Oncol* (2011) 122(1):149–54. doi:10.1016/j.ygyno.2011.03.026
35. Park YT, Jeong JY, Lee MJ, Kim KI, Kim TH, Kwon YD, et al. microRNAs over-expressed in ovarian ALDH1-positive cells are associated with chemoresistance. *J Ovarian Res* (2013) 6(1):18. doi:10.1186/1757-2215-6-18
36. Xu CX, Xu M, Tan L, Yang H, Permuth-Wey J, Kruk PA, et al. microRNA miR-214 regulates ovarian cancer cell stemness by targeting p53/Nanog. *J Biol Chem* (2012) 287(42):34970–8. doi:10.1074/jbc.M112.374611
37. Cheng W, Liu T, Wan X, Gao Y, Wang H. microRNA-199a targets CD44 to suppress the tumorigenicity and multidrug resistance of ovarian cancer-initiating cells. *FEBS J* (2012) 279(11):2047–59. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08589.x
38. Wang Z, Ting Z, Li Y, Chen G, Lu Y, Hao X. microRNA-199a is able to reverse cisplatin resistance in human ovarian cancer cells through the inhibition of mammalian target of rapamycin. *Oncol Lett* (2013) 6(3):789–94. doi:10.3892/ol.2013.1448
39. Cowden Dahl KD, Dahl R, Kruichak JN, Hudson LG. The epidermal growth factor receptor responsive miR-125a represses mesenchymal morphology in ovarian cancer cells. *Neoplasia* (2009) 11(11):1208–15. doi:10.1593/neo.09942
40. Luo X, Dong Z, Chen Y, Yang L, Lai D. Enrichment of ovarian cancer stem-like cells is associated with epithelial to mesenchymal transition through a miRNA-activated AKT pathway. *Cell Prolif* (2013) 46(4):436–46. doi:10.1111/cpr.12038
41. Corney DC, Hwang CI, Matoso A, Vogt M, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, et al. Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clin Cancer Res* (2010) 16(4):1119–28. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2642
42. Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 2008;7:3112–3118
43. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* 2001, 7, 1267–1278.

44. Vandewalle C, Comijn J, de Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, van Roy F, Berx G. *SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions.* *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, 6566–6578
45. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. *DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells.* *Oncogene* 2005, 24, 2375–2385
46. Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P et al. *The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity.* *Oncogene* 2007, 26, 6979–6988
47. Yeh YM, Chuang CM, Chao KC, Wang LH. *microRNA-138 suppresses ovarian cancer cell invasion and metastasis by targeting SOX4 and HIF-1alpha.* *Int J Cancer* (2013) 133(4):867–78. doi:10.1002/ijc.28086
48. Jabbari N, Reavis AN, McDonald JF. *Sequence variation among members of the miR-200 microRNA family is correlated with variation in the ability to induce hallmarks of mesenchymal-epithelial transition in ovarian cancer cells.* *J Ovarian Res* (2014) 7(1):12. doi:10.1186/1757-2215-7-12
49. Kim NH, Kim HS, Li XY, Lee I, Choi HS, Kang SE, et al. *A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial–mesenchymal transition.* *J Cell Biol* 2011;195:417-433
50. Corney DC, Hwang CI, Matoso A, Vogt M, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, et al. *Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers.* *Clin Cancer Res* 2010;16:1119-1128
51. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, et al. *microRNA-21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators.* *Mol Cell Biol* (2008) 28(17):5369–80. doi:10.1128/MCB.00479-08
52. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. *microRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.* *Gastroenterology* (2007) 133(2):647–58. doi:10.1053/j.gastro.2007. 05.022
53. Orend G, Chiquet-Ehrismann R. *Tenascin-C induced signaling in cancer.* *Cancer Lett* (2006) 244(2):143–63. doi:10.1016/j.canlet.2006.02.017
54. Sengupta S, denBoon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, et al. *microRNA-29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins.* *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105(15):5874–8. doi:10.1073/pnas.0801130105
55. Sorrentino A, Liu CG, Addario A, Peschle C, Scambia G, Ferlini C. *Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells.* *Gynecol Oncol* (2008) 111(3):478–86. doi:10.1016/j.ygyno.2008.08.017
56. Negrini M, Calin GA. *Breast cancer metastasis: a microRNA story.* *Breast Cancer Res* (2008) 10(2):203. doi:10.1186/bcr1867

57. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* (2008) 451(7175):147–52. doi:10.1038/nature06487
58. Lai Y, Zhang X, Zhang Z, Shu Y, Luo X, Yang Y, et al. The microRNA-27a: ZBTB10-specificity protein pathway is involved in follicle stimulating hormone-induced VEGF, Cox2 and survivin expression in ovarian epithelial cancer cells. *Int J Oncol* (2013) 42(2):776–84. doi:10.3892/ijo.2012.1743
59. He J, Jing Y, Li W, Qian X, Xu Q, Li FS, et al. Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis. *PLoS One* (2013) 8(2):e56647. doi:10.1371/journal.pone.0056647
60. Xu Q, Liu LZ, Qian X, Chen Q, Jiang Y, Li D, et al. miR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis. *Nucleic Acids Res* (2012) 40(2):761–74. doi:10.1093/nar/gkr730
61. Vecchione A, Belletti B, Lovat F, Volinia S, Chiappetta G, Giglio S, et al. A microRNA signature defines chemoresistance in ovarian cancer through modulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110(24):9845–50. doi:10.1073/pnas.1305472110
62. Liu W, Mao SY, Zhu WY. Impact of tiny miRNAs on cancers. *World J Gastroenterol* 2007; 13:497-502.
63. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 2005; 120:21-24
64. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58:1001-1009
65. Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 2006; 342:129-138
66. Park SM, Shell S, Radjabi AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, et al. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle* 2007; 6:2585-2590
67. Medina R, Zaidi SK, Liu CG, Stein JL, van Wijnen AJ, Croce CM, et al. MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. *Cancer Res* 2008; 68:2773-2780
68. Mor G, Visintin I, Lai Y, Zhao H, Schwartz P, Rutherford T, et al. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:7677-7682
69. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 110:13–21
70. Zhou J, Gong G, Tan H, Dai F, Zhu X, Chen Y, et al. Urinary microRNA-30a-5p is a potential biomarker for ovarian serous adenocarcinoma. *Oncol Rep.* 2015; 33:2915–23

71. Häusler SF, Keller A, Chandran PA, Ziegler K, Zipp K, Heuer S, et al. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br J Cancer*. 2010; 103:693–700
72. Kan CW, Hahn MA, Gard GB, Maidens J, Huh JY, Marsh DJ, et al. Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2012; 12:627
73. Chung YW, Bae HS, Song JY, Lee JK, Lee NW, Kim T, et al. Detection of microRNA as novel biomarkers of epithelial ovarian cancer from the serum of ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Cancer*. 2013; 23:673–9
74. Zheng H, Zhang L, Zhao Y, Yang D, Song F, Wen Y, et al. Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *PLoS One*. 2013; 8:e77853
75. Suryawanshi S, Vlad AM, Lin HM, Mantia-Smaldone G, Laskey R, Lee M, et al. Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:1213–24
76. Zuberi M, Mir R, Das J, Ahmad I, Javid J, Yadav P, et al. Expression of serum miR-200a, miR-200b, and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features. *Clin Transl Oncol*. 2015; 17:779–87
77. Meng X, Joosse SA, Müller V, Trillsch F, Milde-Langosch K, Mahner S, et al. Diagnostic and prognostic potential of serum miR-7, miR-16, miR-25, miR-93, miR-182, miR-376a and miR-429 in ovarian cancer patients. *Br J Cancer*. 2015; 113:1358–66
78. Kapetanakis NI, Uzan C, Jimenez-Pailhes AS, Gouy S, Bentivegna E, Morice P, et al. Plasma miR-200b in ovarian carcinoma patients: distinct pattern of pre/post-treatment variation compared to CA125 and potential for prediction of progression-free survival. *Oncotarget*. 2015;6: 36815–24
79. Scholler N, Urban N. CA125 in ovarian cancer. *Biomark Med*. 2007; 1:513–523. [PubMed: 20477371]
80. Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*. 2001; 276:27371–27375. [PubMed: 11369781]
81. Laios A, O'Toole S, Flavin R, Martin C, Kelly L, Ring M, et al. Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Mol Cancer*. 2008; 7:35. [PubMed: 18442408]
82. Guo LM, Pu Y, Han Z, Liu T, Li YX, Liu M, et al. MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF-kappaB1. *FEBS J*. 2009; 276:5537–5546. [PubMed: 19702828]
83. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, et al. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene*. 1999; 238:375–385. [PubMed: 10570965]

84. Anastasi E, Marchei GG, Viggiani V, Gennarini G, Frati L, Reale MG. HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2010; 31:113–119. [PubMed: 20358424]
85. Nagaraja AK, Creighton CJ, Yu Z, Zhu H, Gunaratne PH, Reid JG, et al. A link between mir-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer. *Mol Endocrinol.* 2010; 24:447–463. [PubMed: 20081105]
86. Wyman SK, Parkin RK, Mitchell PS, Fritz BR, O'Briant K, Godwin AK, et al. Repertoire of microRNAs in epithelial ovarian cancer as determined by next generation sequencing of small RNA cDNA libraries. *PLoS One.* 2009; 4:e5311. [PubMed: 19390579]
87. Vaksman O, Tropé C, Davidson B, Reich R. Exosome-derived miRNAs and ovarian carcinoma progression. *Carcinogenesis.* 2014; 35:2113–20
88. Xu YZ, Xi QH, Ge WL, Zhang XQ. Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14:1057–60
89. Gao YC, Wu J. MicroRNA-200c and microRNA-141 as potential diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2015; 36:4843–50
90. Benson EA, Skaar TC, Liu Y, Nephew KP, Matei D. Carboplatin with Decitabine Therapy, in Recurrent Platinum Resistant Ovarian Cancer, Alters Circulating miRNAs Concentrations: A Pilot Study. *PLoS One.* 2015; 10:e0141279
91. Liu J, Sun H, Wang X, Yu Q, Li S, Yu X, et al. Increased exosomal microRNA-21 and microRNA-146a levels in the cervicovaginal lavage specimens of patients with cervical cancer. *Int J Mol Sci.* 2014; 15:758–73
92. Zhang DZ, Lau KM, Chan ES, Wang G, Szeto CC, Wong K, et al. Cell-free urinary microRNA-99a and microRNA-125b are diagnostic markers for the non-invasive screening of bladder cancer. *PLoS One.* 2014; 9:e100793
93. Van Jaarsveld, M.T.; Helleman, J.; Berns, E.M.; Wiemer, E.A. MicroRNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010, 42, 1282–1290
94. Mozzetti S, Ferlini C, Concolino P, Filippetti F, Raspaglio G, Prislei S, Gallo D, Martinelli E, Ranelletti FO, Ferrandina G et al. Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 298–305
95. Kavallaris M, Annereau JP, Barret JM. Potential mechanisms of resistance to microtubule inhibitors. *Semin. Oncol.* 2008, 35, S22–S27
96. Umezu T, Shibata K, Kajiyama H, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Taxol resistance among the different histological subtypes of ovarian cancer may be associated with the expression of class III β -tubulin. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2008, 27, 207–212

97. Cochrane DR, Spoelstra NS, Howe EN, Nordeen SK, Richer JK. MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Mol. Cancer Ther.* 2009, 8, 1055–1066
98. Cochrane DR, Howe EN, Spoelstra NS, Richer JK. Loss of miR-200c: A marker of aggressiveness and chemoresistance in female reproductive Cancers. *J. Oncol.* 2010, 2010, 821717
99. Leskelä S, Leandro-García LJ, Mendiola M, Barriuso J, Inglada-Pérez L, Muñoz I, Martínez-Delgado B, Redondo A, de Santiago J, Robledo M, et al. The miR-200 family controls beta-tubulin III expression and is associated with paclitaxel-based treatment response and progression-free survival in ovarian cancer patients. *Endocr. Relat. Cancer* 2011, 18, 85–95
100. Marchini S, Cavaliere D, Fruscio R, Calura E, Garavaglia D, Fuso Nerini I, Mangioni C, Cattoretti G, Clivio L, Beltrame L, et al. Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: A retrospective study of two independent tumour tissue collections. *Lancet Oncol.* 2011, 12, 273–285
101. Prislei S, Martinelli E, Mariani M, Raspaglio G, Sieber S, Ferrandina G, Shahabi S, Scambia G, Ferlini C. MiR-200c and HuR in ovarian cancer. *BMC Cancer* 2013, 13, 72
102. Hong L, Yang Z, Ma J, and Fan D. “Function of miRNA in controlling drug resistance of human cancers,” *Current Drug Targets*, vol. 14, pp. 1118–1127, 2013
103. Yang N, Kaur S, Volinia S et al. “MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer,” *Cancer Research*, vol. 10, pp. 2687–2693, 2004
104. Mitamura T, Watari H, Wang L et al. “Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinaseMET,” *Oncogenesis*, vol. 2, article e40, 2013
105. Aqeilan RI, Calin GA, and Croce CM. “MiR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 17, no. 2, pp. 215–220, 2010
106. Leskelä S, Leandro-García LJ, Mendiola M et al. “The miR-200 family controls β -tubulin III expression and is associated with paclitaxel-based treatment response and progression-free survival in ovarian cancer patients,” *Endocrine-Related Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 85–95, 2011
107. Boyerinas B, Park SM, Murmann AE et al., “Let-7 modulates acquired resistance of ovarian cancer to Taxanes via IMP-1-mediated stabilization of multidrug resistance 1,” *International Journal of Cancer*, vol. 130, no. 8, pp. 1787–1797, 2012
108. Lu L, Schwartz P, Scarampi S et al., “MicroRNA let-7a: a potential marker for selection of paclitaxel in ovarian cancer management,” *Gynecologic Oncology*, vol. 122, no. 2, pp. 366–371, 2011

109. Nagaraja AK, Creighton CJ, Yu Z et al. "A link between mir-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer," *Molecular Endocrinology*, vol. 24, no. 2, pp. 447–463, 2010
110. Peng DX, Luo M, Qiu LW, He YL, and Wang XF. "Prognostic implications of microRNA-100 and its functional roles in human epithelial ovarian cancer," *Oncology Reports*, vol. 27, no. 4, pp. 1238–1244, 2012
111. Fu X, Tian J, Zhang L, Chen Y, and Hao Q. "Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells," *FEBS Letters*, vol. 586, no. 9, pp. 1279–1286, 2012
112. Garzon R, Marcucci M, and Croce CM. "Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, no. 10, pp. 775–789, 2010
113. Lu Y, Xiao J, Lin H et al. "A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference," *Nucleic Acids Research*, vol. 37, no. 3, article e24, 2009
114. Dai F, Zhang Y, Zhu X, Shan N, and Chen. "Anticancer role of MUC1 aptamer-miR-29b chimera in epithelial ovarian carcinoma cells through regulation of PTEN methylation," *Targeted Oncology*, vol. 7, pp. 217–225, 2012
115. Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S et al. "miR-92a inhibits peritoneal dissemination of ovarian cancer cells by inhibiting integrin $\alpha 5$ expression," *The American Journal of Pathology*, vol. 182, pp. 1876–1889, 2013
116. Cittelly DM, Dimitrova I, Howe EN et al. "Restoration of miR-200c to ovarian cancer reduces tumor burden and increases sensitivity to paclitaxel," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 11, pp. 2556–2565, 2012
117. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, and Lötvall JO. "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells," *Nature Cell Biology*, vol. 9, no. 6, pp. 654–659, 2007
118. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, and Ochiya T. "Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 23, pp. 17442–17452, 2010
119. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, and Ochiya T. "MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk," *Silence*, vol. 1, no. 1, article 7, 2010
120. Gnyszka A, Jastrzebski Z, and Flis S. "DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer," *Anticancer Research*, vol. 33, pp. 2989–2996, 2013
121. Fang F, Balch C, Schilder J et al. "A phase 1 and pharmacodynamics study of decitabine in combination with carboplatin in patients with recurrent, platinum-resistant, epithelial ovarian cancer," *Cancer*, vol. 116, no. 17, pp. 4043–4053, 2010

122. Sessa C, Ten Bokkel Huinink W, Stoter G, Renards J, and Cavalli F. "Phase II study of 5-Aza-²-deoxycytidine in advanced ovarian carcinoma," *European Journal of Cancer*, vol. 26, no. 2, pp. 137–138, 1990
123. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* (2008) 141(5):672–5. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x
124. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105(30):10513–8. doi:10.1073/pnas.0804549105
125. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* (2008) 18(10):997–1006. doi:10.1038/cr.2008.282
126. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* (2009) 112(1):55–9. doi:10.1016/j.ygyno.2008.08.036
127. Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* (2010) 28(10):1721–6. doi:10.1200/JCO.2009.24.9342
128. Mateescu B, Batista L, Cardon M, Gruosso T, de Feraudy Y, Mariani O, Nicolas A, Meyniel JP, Cottu P, Sastre-Garau X et al. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nat. Med.* 2011, 17, 1627–1635
129. Ramanathan B, Jan KY, Chen CH, Hour TC, Yu HJ, Pu YS. Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity. *Cancer Res.* 2005, 65, 8455–8460.
130. Alexandre J, Hu Y, Lu W, Pelicano H, Huang P. Novel action of paclitaxel against cancer cells: Bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2007, 67, 3512–3517